

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JEFFERSON DA LUZ COSTA

**SELEÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PRODUTORES DE ÁCIDO INDOL
ACÉTICO (AIA) PARA FORMULAÇÃO DE INOCULANTES**

Curitiba

2012

JEFFERSON DA LUZ COSTA

**SELEÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PRODUTORES DE ÁCIDO INDOL
ACÉTICO (AIA) PARA FORMULAÇÃO DE INOCULANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Dr. Carlos Ricardo Soccol

Co-orientadora: Dr^a Ida Chapaval Pimentel

Curitiba

2012

(TERMO DE APROVAÇÃO)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Raimundo e Amujaci por todo amor, incentivo e carinho dedicados durante minha vida.

Aos meus irmãos Júnior, Gustavo e Rayanne pelo seu apoio, paciência e amor incondicional.

EPÍGRAFE

“Seja senhor das tuas vontades e escravo da tua consciência.”
(Aristóteles)

“Man muss noch Chaos in sich haben, um einen tanzenden Stern gebären zu können.”
(Friedrich Nietzsche).

"Sob a direção de um forte general, não haverá jamais soldados fracos."
(Sócrates).

AGRADECIMENTOS

À escola de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná através do Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol por sua orientação e pelo exemplo de dedicação e sugestões valiosas que servirão para a vida.

À minha família por todo apoio e carinho que dedicaram durante a minha vida de pós-graduando durante o período de minha estada em Curitiba.

Ao Governo Brasileiro, através da Universidade Federal do Tocantins (UFT), pelo suporte financeiro.

Ao meu ex-orientador de graduação e participante de minha banca de defesa de dissertação, o Prof. Dr. Eduardo Andrea Lemus Erasmo pelos ensinamentos durante a minha graduação e chefe da UFT.

Às professoras Adenise Lorenci Woiciechowski e minha Co-orientadora Ida Chapaval Pimentel meus sinceros agradecimentos por acrescentarem conhecimento para essa pesquisa e por aceitarem participar da minha banca de defesa.

À Coordenação e aos Professores da Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR pela colaboração e ensinamentos.

Aos colegas Prof^o. André Luís Lopes da Silva e Prof^o. Sidnei Emilio Bordignon Júnior que tanto contribuíram seja na execução de ensaios e discussão de dados, além do companheirismo e conversas descontraídas.

Aos meus amigos da república “Gb3” nacionais e internacionais por termos passado momentos agradáveis e pela grande amizade formada.

À todos colegas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR pela amizade e companheirismo.

RESUMO

Fungos endofíticos colonizam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem que aparentemente causem danos, conferindo a seus hospedeiros vantagens como a proteção contra ataques de insetos e patógenos de plantas, alterando características fisiológicas, morfológicas de plantas e na produção de substâncias de interesse biotecnológico. O presente trabalho teve por principal objetivo o isolamento e seleção de fungos endofíticos produtores de ácido indol acético (AIA) como inoculantes. Para o isolamento dos fungos endofíticos de pinhão manso, as folhas foram lavadas superficialmente em água corrente e sabão para retirar impurezas. Três cepas de fungos endofíticos (*Trichoderma* sp., *Beauveria bassiana* e *Penicillium* sp.) do banco biológico do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LabMicro) do Departamento de Patologia Básica da UFPR foram usadas como controle positivo. Para produção de AIA utilizou-se os meios; Czapek e fermentação em estado sólido (Polpa cítrica). Foram isolados trinta fungos endofíticos de folhas de pinhão manso como possíveis candidatos para produção de AIA. Através de testes qualitativos foram selecionadas quatro cepas (Isolado 7, 18, 19 e 20) para avaliações quantitativas de produção de AIA. O fungo *Trichoderma* sp. apresentou os melhores resultados em comparação com as demais cepas produtoras de AIA. Foram feitas análises físico-químicas da polpa cítrica: pH 5,56; umidade 11,3%; 5,67% de cinzas, 5,61% de proteínas totais, 18,74% de açúcares totais, 10,21% de açúcares redutores, atividade da água 0,621. A FES (Fermentação em estado sólido) foi superior a FSm (Fermentação submersa) para o *Trichoderma* sp, resultando numa produção de 55,6 mg de AIA/g PC seca e em FSm 49,5 mg.L⁻¹ de AIA. Otimizou-se os parâmetros físico-químicos da fermentação com a polpa cítrica (Umidade, pH) com *Trichoderma* sp. onde a melhor produção se deu a 75% de umidade e pH de 5,5 e sem a adição de fontes de nitrogênio. Foram realizados estudos complementares de co-cultura de *Trichoderma* sp. com brotos de cana-de-açúcar variedade RB 72 454 em Biorreator de Imersão por Bolhas aos 15 dias de cultivo *in vitro*, sendo que o tratamento 1x10³ esporos por mL promoveu aumento significativo na parte aérea e massa fresca total de brotos de cana-de-açúcar. Estudos de crescimento inicial de plantas de pinhão manso oriundas de sementes peletizadas com diferentes quantidades de extrato fermentado de *Trichoderma* sp. B1000 propiciou maior crescimento de parte aérea de 24,08 cm. A partir dos resultados obtidos conclui-se que o *Trichoderma* sp. apresentou maior capacidade de sintetizar AIA, a partir de triptofano como precursor, em Polpa Cítrica seca sem adição de nitrogênio, propiciando melhor resultado na aclimatização após co-cultivo de plantas de cana-de-açúcar-, bem como, na inoculação do extrato fermentado em sementes de pinhão manso em casa de vegetação.

Palavras-chave: *Trichoderma* sp., FES, ácido indol acético, polpa cítrica, biorreatores de imersão por bolhas

ABSTRACT

Endophytic fungi colonize the interior of plant tissue and organs without apparently damaging, confer to their hosts benefits as protection against attacks from insects and plant pathogens, changing physiological characteristics, plant morphological and production of substances of biotechnological interest. The objective of this work was to isolation and selection of endophytic fungi through the production of indole acetic (IAA) for production inoculants For the isolation of endophytic fungi, leaves were lightly washed in running water and soap to remove impurities. Three strains of endophytic fungi (*Trichoderma* sp., *Beauveria bassiana* and *Penicillium* sp.) of Biological Bank of Laboratory of Microbiology and Molecular Biology (LabMicro) Department of Pathology Basic UFPR were used with positive control. For production of indole acetic acid (IAA) in submerged fermentation (SF) was used culture media Czapek (Submerged fermentation) and Pulp citric (Solid State fermentation). 30 isolated endophytic fungi of leaves of *Jatropha curcas* was tested for production of IAA with four strains by producing IAA (Isolates 7, 18, 19 and 20). The strain *Trichoderma* sp. was then submitted to kinetic production of IAA in SSF using Citric Pulp as substrate. We carried out the optimization of physical and chemical parameters of the fermentation with pulp citric (moisture, pH and nitrogen) with *Trichoderma* sp. where the best production occurred at pH of 5.56, 11.3% moisture, 5.67% ash, 5.61% de total protein, 18.74% of totals sugar, 10.21% of redutors sugar and 0,621 water activity. SSF was superior to FSm for production of IAA by *Trichoderma* sp (55.6 mg IAA g per PC dry and SmF 49.5 mg.L⁻¹). Optimized to the physicochemical parameters of the fermentation with pulp citric (moisture, pH) where the best production occurred at 75% moisture and 5.5 pH and without addition of nitrogen source. Additional studies were performed to co-culture of *Trichoderma* sp. with shoots of sugarcane variety RB 72 454 bioreactor of immersion by bubbles in 15 days of *in vitro* culture, and the treatment 1x10³ spores per ml led to increase of shoot and total fresh biomass of sugarcane. Studies of initial growth of Physic nut from pelleted seeds with different amounts of fermented extract of *Trichoderma* sp.called "B1000" provided more growth of biomass of 24.08 cm. The results of this work the *Trichoderma* sp. tested showed the ability to synthesize IAA from tryptophan as precursor through pulp citric dry without addition of nitrogen source, as was favorable in the acclimatization of plants from sugarcane and inoculation of seeds of physic nut in greenhouse.

Keywords: *Trichoderma* sp., Solid State Fermentation, indole-3-acetic acid, pulp citric, bioreactor immersion by bubbles

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Trichoderma</i> spp.	19
Figura 2 - Estrutura química de algumas auxinas naturais e sintéticas.....	21
Figura 3 - Molécula de Triptofano.....	22
Figura 4 - Biossíntese do ácido indol acético (AIA) a partir do aminoácido triptofano.....	24
Figura 5 - Biorreator de Imersão por Bolhas.....	28
Figura 6 - Câmara de Neubauer.....	34
Figura 7 - Colônias de fungos isolados de folhas de <i>Jatropha curcas</i> L. após 10 dias de isolamento e cultivo em meio de cultura BDA a 28°C.....	42
Figura 8 - Plantas de cana-de-açúcar em Biorreator de Imersão por Bolhas (BIB).....	49
Figura 9 - Brotos de cana-de-açúcar co-cultivada com 10 ⁶ esporos por mL de <i>Trichoderma</i> sp. no BIB.....	50
Figura 10 – Plantas de cana-de-açúcar aclimatizadas em casa de vegetação.....	52
Figura 11 – Plantas de pinhão manso após 60 dias em casa de vegetação oriundas de sementes peletizadas com diferentes quantidades de extrato fermentado de <i>Trichoderma</i> sp.....	55
Figura 12 – Comparação das plantas de pinhão manso em casa de vegetação (controle) e oriundas de sementes peletizadas com 1000 mg de extrato fermentado de <i>Trichoderma</i> sp. por semente.....	55
Figura 13 – Comparação das raízes de plantas de pinhão manso em casa de vegetação (controle) e oriundas de sementes peletizadas com 1000 mg de extrato fermentado de <i>Trichoderma</i> sp. por semente.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições iniciais das fermentações para seleção das cepas para produção de Ácido Indol Acético (AIA).....	35
Tabela 2 - Características físico-químicas da Polpa Cítrica.....	40
Tabela 3 - Fungos endofíticos produtores de AIA por FSm e FES após 5 dias de cultivo (com 0,5mM de triptofano e ausência de luz).....	40
Tabela 4 - Produção de AIA por <i>Trichoderma</i> sp. em diferentes meios de cultivo (CC – Caldo Czapek, BD - Batata Dextrose) sem e com triptofano a 0,5mM e em função do tempo (horas).....	41
Tabela 5 - Produção de AIA com adição de diferentes fontes de Nitrogênio aos cinco dias de FES com <i>Trichoderma</i> sp.....	43
Tabela 6 - Variação do pH e Umidade inicial para produção de AIA por <i>Trichoderma</i> sp. em FES usando PC.....	44
Tabela 7 - Co-cultura de <i>Trichoderma</i> sp. com brotações de cana-de-açúcar variedade RB 72 454 em Biorreator de Imersão por Bolhas aos 15 dias de cultivo <i>in vitro</i>	45
Tabela 8 - Efeitos da co-cultura de <i>Trichoderma</i> sp. na aclimatização de brotos de cana-de-açúcar variedade RB 72-454 após 30 dias de cultivo em casa de vegetação.....	46
Tabela 9 - Germinação de sementes e crescimento inicial de mudas de pinhão manso peletizadas com <i>Trichoderma</i> sp.....	52
Tabela 10 - Germinação e altura de parte aérea das mudas de pinhão manso peletizadas com diferentes quantidades de inoculo de <i>Trichoderma</i> sp.....	53
Tabela 11 - Crescimento inicial de plantas de pinhão manso oriundas de sementes peletizadas com diferentes quantidades de extrato fermentado de <i>Trichoderma</i> sp. aos 60 dias após a emergência (DAE).....	54

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

UFPR - Universidade Federal do Paraná

UFT - Universidade Federal do Tocantins

FES - Fermentação em Estado Sólido

F_{Sm} - Fermentação Submersa

AIA - Ácido indol acético

a_w - Atividade de água

PC - Polpa cítrica

LPB - Laboratório de Patologia Básica

BDA – Batata Dextrose Agar

BD – Batata Dextrose

BAP – (6-Benzilaminopurina)

BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio

ANA - Ácido naftalenoacético

MS - Meio de cultura (MURASHIGE e SKOOG 1962)

BIB[®] - Biorreator de imersão por bolhas

SDA/MAPA – Secretaria de Defesa Agropecuaria/Ministério da Agricultura.

g - grama

L - litro

v/m - volume/massa

mL - mililitro

mg - Miligrama

mm - milímetro

mM – Milímolar

rpm - rotações por minuto

μL - Microlitro

μM - Micromolar

H₂SO₄ - ácido sulfúrico

FeCl₃ - cloreto férrico

pH - potencial hidrogeniônico

°C - graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS.....	16
1.1.1 Objetivo Geral.....	16
1.1.2 Objetivos específicos.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	17
2.1. MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS	17
2.1.1. Biodiversidade de endofíticos	17
2.1.2. Fungos endofíticos	18
2.1.3. <i>Trichoderma</i> spp.....	19
2.2. AUXINAS	20
2.2.1 Ácido indol acético (AIA).....	22
2.2.2. Produção do AIA	23
2.3. Fermentação Submersa/Fermentação em estado sólido	25
2.4 CANA-DE-AÇÚCAR (<i>Sacharum officinarum</i> L.)	29
2.4.1 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS	26
2.4.1.1. Biorreator de Imersão por Bolhas (BIB).	27
2.5. PINHÃO MANSO (<i>Jatropha curcas</i> L.).....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1. MICRO-ORGANISMOS	32
3.1.1 Cepas avaliadas	32
3.1.2. Isolamento dos fungos endofíticos.....	33
3.2. SUBSTRATOS.....	33
3.2.1. Meio Batata Dextrose (BD)	33
3.2.2. BDA.....	33
3.2.3. Meio Czapek-Dox (modificado).....	34
3.2.4. Meio para fermentação em estado sólido (FES)	35
3.2.5. Obtenção e análises do substrato/suporte.....	34
3.3. SELEÇÃO DAS CEPAS PARA PRODUÇÃO DE AIA	35
3.3.1 Preparo do Inóculo	35
3.3.2 Recuperação de esporos/ contagem de esporos.....	36
3.3.3. Seleção das cepas/meios de cultura para produção de inóculo.....	36
3.3.4 Seleção qualitativa/quantitativa de AIA.....	37
3.3.5. Otimização de variáveis físicas do Fermentado (pH e umidade %) e fontes de nitrogênio.....	38
3.3.6. FES durante a cinética em Frascos de Erlenmeyer	38

3.4. PROPAGAÇÃO IN VITRO DE CANA-DE-AÇÚCAR (var. RB 72.454).....	39
3.4.1 Estabelecimento <i>in vitro</i> da variedade de cana-de-açúcar RB 72.454	39
3.4.2. Multiplicação <i>in vitro</i>	39
3.4.3. Avaliação da concentração de esporos de <i>Trichoderma</i> sp.no co-cultivo de cana-de-açúcar utilizando o Biorreator de Imersão por Bolhas BIB	39
3.5 Testes de germinação e vigor de sementes de pinhão manso	40
3.6 Efeito de <i>Trichoderma</i> sp. no crescimento de pinhão manso em casa de vegetação.	41
3.7. Análise estatística e condições de cultivo	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1. CARACTERIZAÇÃO DA POLPA CÍTRICA	43
4.2. ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE CEPAS PARA PRODUÇÃO DE AIA	43
4.3. PADRONIZAÇÃO E INFLUÊNCIA DOS MEIOS DE CULTURA SOBRE A PRODUÇÃO DE AIA.	47
4.3.1. Avaliação da adição de fontes de nitrogênio na produção de aia por <i>Trichoderma</i> sp em FES	48
4.3.2. Otimização das variáveis pH e umidade na produção de aia por <i>Trichoderma</i> sp em FES	49
4.4. Co-cultura de <i>Trichoderma</i> com brotações de cana-de-açúcar	50
4.5. GERMINAÇÃO DE SEMENTES E CRESCIMENTO INICIAL DE MUDAS DE PINHÃO MANSO PELETIZADAS COM <i>Trichoderma</i> sp.	54
5. CONCLUSÕES	59
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	60
7. REFERÊNCIAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

As inovações na agricultura brasileira introduzidas pela pesquisa no aperfeiçoamento da qualidade e produtividade são muitas, tais como, o sistema de plantio direto, o manejo integrado de pragas, o suporte na criação de variedades e espécies que se adaptam às diferentes condições ambientais e além dessas, está a utilização de micro-organismos na produção de inoculantes agrícolas. O Departamento de Fiscalização de Insumos/Inoculantes Agrícolas/Secretaria de Defesa Agropecuária (DFIA/SDA) do Ministério da Agricultura é o responsável pela fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes e biofertilizantes destinados à agricultura brasileira, onde definem como sendo inoculante agrícola uma substância que contenha micro-organismo(s) com a atuação favorável ao desenvolvimento vegetal, são divididos em três categorias; inoculantes de rizóbios, inoculantes de bactérias promotoras de crescimento e os produzidos por micro-organismos entomopatogênicos (SDA/MAPA, 2009).

Os hormônios vegetais (auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico) são substâncias orgânicas que desempenham diferentes funções na regulação do crescimento da planta em diferentes fases de desenvolvimento dos seus tecidos (Raven *et al.*, 2001). O ácido indol acético (AIA), possui fórmula molecular $C_{10}H_9NO_2$, tem moderada solubilidade em água, ponto de fusão de 168-170 °C e massa molecular de 175,18, sob altas temperaturas começa a se decompor em outras substâncias, O AIA é a principal auxina de ocorrência natural, sendo sintetizado por vários micro-organismos endofíticos como bactérias e fungos, estando sua produção associada ou não às plantas. Em plantas, o AIA microbiano produzido por bactérias do gênero *Azospirillum* spp, *Alcaligenes faecalis*, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp, *Xanthomonas* sp, *Herbaspirillum seropedicae*, *Rhizobium* spp e *Bradyrhizobium* spp têm sido relacionados ao estímulo de crescimento, enquanto os produzidos pelas espécies *Pseudomonas savastanoi*, *P. syringae*, *Agrobacterium tumefaciens* e *A. rhizogenes* relacionados às patogênicas (Patten e Glick, 1996).

O Agronegócio Brasileiro ajuda no superávits comerciais A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é uma fonte de biomassa energética

importante para a agroindústria movimentando a economia de diversos países tropicais e subtropicais. A cana-de-açúcar é um dos produtos mais dinâmicos do agronegócio brasileiro sendo cultivada nas mais diversas regiões do país, sendo que a cada ano, há um aumento das áreas de cultivo principalmente nas regiões norte e nordestino do Brasil. A cana-de-açúcar de açúcar terá uma projeção estimada de aumento em área plantada saltando de 9,060 milhões de hectares na safra 2011/2012 para 10,911 milhões de hectares na safra 2021/2022, um acréscimo de 16,94%, e estimativas de produção 607,852 milhões de toneladas na safra 2011/2012 para 793,206 milhões de toneladas, um aumento de 30,5% em dez anos, referindo-se à cana-de-açúcar destinada à produção de açúcar, álcool e outros fins como forrageiras, cachaça, etc. As projeções de área plantada até 2021/2022, mostram que a expansão de novas áreas deverá ocorrer 2,1% de crescimento ao ano. (AGE/Mapa e SGE/Embrapa, 2011).

O desenvolvimento de novas metodologias, como, equipamentos na cultura de tecidos de células vegetais se fazem necessários para o aumento da produção massal em escala comercial, além de tentar reduzir custos de produção, neste contexto, a utilização de biorreatores visando obtenção de material clonal e/ou produção de metabólitos secundários de interesse industrial. Os primeiros biorreatores para multiplicação de plantas foram inicialmente utilizados nos EUA, Japão e França (Ziv, 2000; Rech Filho, 2004), sendo que o primeiro relato sobre o seu uso foi feito por Takayama e Misawa (1981).

Jatropha curcas L. pertence à família Euphorbiaceae, é amplamente distribuída em áreas tropicais e subtropicais, e em algumas áreas temperadas (Costa *et. al.*, 2010). Plantas de pinhão manso obtidas via semente apresentam desuniformidade nos plantios, o que não é desejado comercialmente (Nunes *et al.*, 2008). Assim, tenta-se buscar formas de controlar e padronizar métodos de obtenção de germinação e formação de *stands* de mudas para plantios em larga escala.

O objetivo desse trabalho foi selecionar fungos endofíticos para produção de Ácido Indol Acético como possíveis promotores de crescimento de plantas para formulação de inoculantes agrícolas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Obtenção de inoculantes a partir do isolamento e seleção de fungos endofíticos produtores de ácido indol acético (AIA).

1.1.2 Objetivos específicos

Caracterizar substrato/suporte (polpa cítrica) a ser utilizado no processo através de análises físico-químicas

Selecionar fungos endofíticos do banco de cepas do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LabMicro) do Departamento de Patologia Básica da UFPR e isolados de folhas de pinhão manso da área experimental do Campus de Gurupi da Universidade Federal do Tocantins para a produção de ácido indol acético (AIA);

Testar a eficiência de fungos endofíticos como inoculante em co-cultivo com brotos de cana-de-açúcar em Biorreator de Imersão por Bolhas (BIB).

Testar a eficiência do extrato fermentado (fungos endofíticos crescidos em polpa cítrica) em sementes de pinhão manso em casa de vegetação.

Os processos foram realizados nos laboratórios de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia; Microbiologia e Biologia Molecular (LabMicro) da Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e no laboratório de Microbiologia Aplicada, Campus Universitário de Gurupi, Universidade Federal do Tocantins (UFT).

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1. MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS

2.1.1. Biodiversidade de endófitos

As plantas desenvolvem complexos mecanismos adaptativos, sendo que o estabelecimento das mesmas em seus respectivos habitats envolve a sua capacidade em interagir com diferentes espécies de seres vivos. É provável que as associações fúngicas desempenharam um longo e importante papel na evolução da vida na Terra, o que pode ser confirmado a partir de registros fósseis que sugerem que algumas dessas interações existem há mais de 400 milhões de anos (Redecker *et al.*, 2000). A chave para a exploração bem sucedida de fungos endofíticos na agricultura é identificar e compreender os mecanismos de funcionamento da bioatividade e/ou biocontrole (Brar-Kaur *et al.*, 2012). Entre estas associações, destacam-se as mutualísticas, como os fungos micorrízicos e as bactérias fixadoras de nitrogênio. Além destes, outros micro-organismos, chamados de endofíticos, que tipicamente são fungos, leveduras, actinobactérias ou bactérias que habitam de forma assintomática os tecidos vegetais, têm recebido especial atenção devido à sua importância em relação a diferentes espécies de plantas (Neto *et al.*, 2002).

Micro-organismos endofíticos estão presentes no interior de órgãos e tecidos vegetais como folhas, caules e raízes de várias plantas, aparentemente saudáveis. Em alguns casos, podem produzir danos à planta quando as condições ambientais e o estado fisiológico do hospedeiro são favoráveis (Azevedo, 1998). Os endófitos promotores do crescimento vegetal têm apresentado grande potencial de aplicação agrícola, uma vez que a interação destes micro-organismos pode beneficiar a planta hospedeira por diferentes mecanismos, tais como a fixação biológica de nitrogênio, produção de reguladores de crescimento vegetal, auxinas, ou a produção de antimicrobianos empregados contra fitopatógenos.

Dentre os micro-organismos temos os fungos endofíticos os quais são hospedeiros de plantas, podendo haver ou não inter-especificidade ou dependência. O conhecimento da biodiversidade desses micro-organismos, bem

como a filogenia e as interações bióticas e abióticas, é de extrema importância para se entender as diferentes interações e funcionalidades para a bioprospecção e para aplicações biotecnológicas. As folhas dos vegetais hospedeiros são provavelmente a primeira porta de entrada para os micro-organismos, pois apresentam tecidos mais frágeis e expostos pela presença dos estômatos, ocorrendo posteriormente à migração para os outros tecidos da planta.

2.1.2. Fungos endofíticos

A descoberta de metabólitos de uma determinada planta é complexa, variam de acordo com o tecido e órgão, onde diferenças podem ser vistas entre diferentes estágios de desenvolvimento, indivíduos e entre populações, além da simbiose entre planta e micro-organismo. Mais estudos devem ser realizados para uma melhor compreensão da sua relação com a planta hospedeira e seu papel na produção de metabólitos.

Fungos endofíticos são estudados para uso no controle biológico de doenças ou pragas, e mostram-se relevantes tanto para descoberta de novas substâncias como produção de metabólitos secundários e aplicação na indústria farmacêutica. Alguns fungos endofíticos não produzem as enzimas hidrolíticas extracelulares, comuns em fungos fitopatogênicos, sugerindo que fungos endofíticos não apresentam enzimas relacionadas à fitopatogenicidade (Silva *et. al.*, 2006).

Para que ocorra a interação de um fungo com a planta o primeiro passo é a adesão de seus esporos à superfície da planta. Os fungos empregam diferentes estratégias, como a produção de adesinas, enzimas, lectinas, interações iônicas e contato hidrofóbico com a cutícula da planta. Alguns fungos utilizam aberturas naturais e ferimentos para penetrarem no tecido da planta, outros empregam estruturas especializadas, denominadas apressórios e localizadas na ponta dos tubos germinativos, os quais criam uma alta pressão de turgor que permite a penetração da hifa na epiderme da planta. Ainda, a penetração pode ser realizada pelo auxílio de enzimas, como cutinases,

pectinases, celulasas, hemicelulasas e ligninases, que degradam cutina e compostos da parede celular. O fungo pode crescer de maneira biotrófica após a infecção da planta obtendo nutrientes do hospedeiro sem provocar a morte das células. Nesse caso, alguns fungos produzem haustórios, estruturas especializadas na obtenção de nutrientes; vitaminas, aminoácidos, polissacarídeos a partir de células hospedeiras. Algumas moléculas que desencadeiam reações de defesa nas plantas, denominadas elicitores, têm sido isoladas de um número considerável de fungos. Hu *et al.*, 2001 isolaram o fungo endofítico *Colletotrichum* sp. em *Artemisia annua* que produziu reguladores de crescimento de plantas tais como AIA. Já Oliveira *et al.*, 2012 trabalhando com *Trichoderma* sp. quantificou AIA utilizando diferentes meios de culturas líquidos.

2.1.3. *Trichoderma* spp.

O gênero *Trichoderma* possui duas fases distintas; Hypocrea (nesta fase é classificado como ascomiceto da ordem Hypocreales, denominada de teleomórfica, assexual.), a segunda fase, denominada anamórfica, prevalece uma etapa assexual. Pertencente à Sub-divisão Deuteromycotina, ordem Hifomicetes e família Moniliaceae (SAMUELS, 2006).

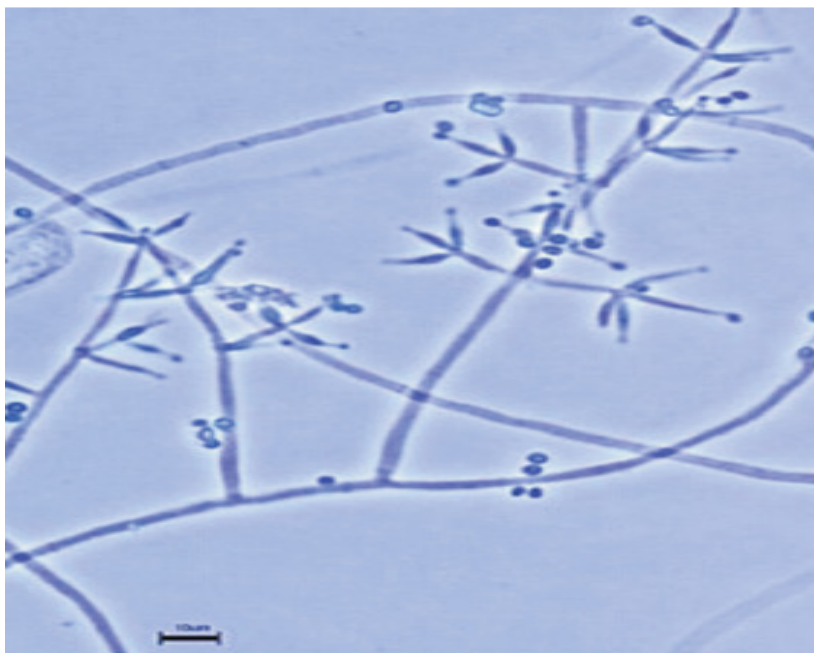


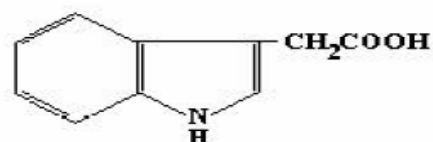
Figura 1: *Trichoderma* spp.

Fonte: Murilo Lobo Júnior, 2009

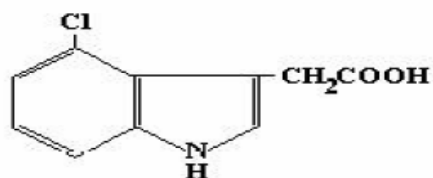
Trichoderma spp. são fungos de vida livre, encontrados em ecossistemas da raiz e solo. Atuam no controle biológico, produção de enzimas, solubilização de fosfatos, podem produzir metabólitos que melhoram o crescimento e desenvolvimento de plantas, na produção de AIA (Gravel et. al., 2007; Carvajal et. al., 2009; Machado et. al., 2011; Oliveira et al., 2012).

2.2. AUXINAS

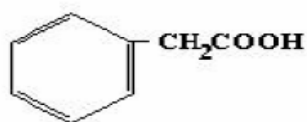
A auxina, termo originário do grego *auxein*, que significa “crescer” ou “aumentar”. As auxinas encontram-se na forma livre, que é a forma biologicamente ativa do hormônio ou no estado covalentemente ligado, forma inativa. As auxinas livres podem ser utilizadas imediatamente pela planta, já as covalentemente ligadas não estão prontamente disponíveis, mas servem como reserva, atuando na regulação dos níveis de auxinas livres (Mohr & Schopfer, 1995; Taiz & Zeiger, 2004). No entanto, existem outras auxinas endógenas, como o ácido 4-cloro indol acético (4-cloro IAA) e o ácido fenil acético (PAA) (Salisbury & Ross, 1992; Taiz & Zeiger, 2004). Apresentamos a estrutura química de algumas auxinas naturais e sintéticas (Figura 2).

Auxinas naturais

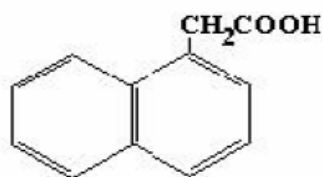
ácido 3- indol acético
(AIA)



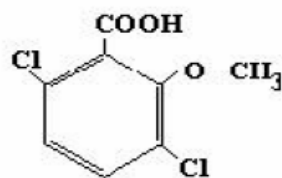
3 ácido 4-cloroindol acético



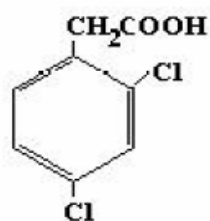
ácido fenilacético

Auxinas sintética

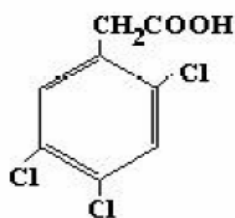
ácido naftaleno acético



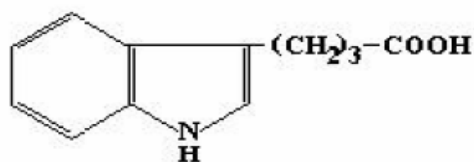
ácido 2-metoxi
3,6-dicloro benzóico



2,4-diclorofenoxiacético
(2,4-D)



ácido 2,4,5triclorofenoxi acético
(2,4,5- T)



ácido 3-indol butírico
(AIB)

(2,4,5- T)

FIGURA 2. Estrutura química de algumas auxinas naturais e sintéticas.

Fonte: Modificado de Marchioro, 2005.

As auxinas são responsáveis por diversos efeitos fisiológicos na planta, que afetam processos do desenvolvimento, além do alongamento e divisão celular (Taiz & Zeiger, 2004). O alongamento ocorre devido à acidificação da parede celular, causada pela liberação de prótons para fora da membrana plasmática. A extrusão de prótons estimula enzimas presentes na membrana plasmática a romper ligações glicosídicas entre polissacarídeos da parede celular, causando assim o seu afrouxamento e diminuição da resistência mecânica da parede celular. A diferença de potencial hídrico gerado favorece a entrada de água na célula e o aumento do potencial de pressão, resultando na distensão da parede celular (Salisbury & Ross, 1992). A biossíntese de auxina está principalmente associada aos tecidos com rápida divisão celular e crescimento, tais como meristemas apicais, gemas, folhas jovens, extremidades de raízes, frutos e sementes em desenvolvimento (Salisbury & Ross, 1992; Arteca, 1996; Taiz & Zeiger, 2004).

Uma das auxinas mais importantes é o AIA, substância que é produzida principalmente no meristema apical (gema) do caule e transportada através das células do parênquima até as raízes. O transporte do AIA é unidirecional, dependendo de energia para ocorrer. Promove o crescimento de raízes e caules, através do alongamento das células recém-formadas nos meristemas. Esse efeito depende, no entanto, da concentração do hormônio. Existem dois estágios onde a presença da auxina é essencial, na iniciação e no desenvolvimento radicial (Smith & Thorpe 1975). O primeiro é marcado pelos eventos de iniciação meristemática e o segundo estágio pelo desenvolvimento de órgãos. Após a descoberta do AIA, outras substâncias sintéticas com atividade semelhante ao AIA foram encontradas, dentre as quais estão alguns fito hormônios utilizados para promover a iniciação radicial, como o ácido indol butírico (IBA) e o ácido naftaleno acético (NAA).

2.2.1 Ácido indol acético (AIA)

O AIA foi o primeiro hormônio descoberto em plantas, atuando no crescimento e desenvolvimento dos vegetais, sendo a principal auxina de ocorrência natural (Taiz & Zeiger, 2004).

O AIA, pertence ao grupo das auxinas, grupo de fitohormônios envolvidos no alongamento do caule, a dominância apical, formação da raiz, desenvolvimento de frutos (Taiz & Zeiger, 2004). O AIA é uma importante auxina que pode regular processos fisiológicos em baixas concentrações, estando relacionado com a expansão celular, atuando nas microfibrilas de celulose e a pressão de turgor, entrada de água na célula, supre a força necessária para que ela ocorra (Peixoto *et al.*, 2011). O AIA pode ser sintetizado e excretado por micro-organismos endofíticos a partir do triptofano, indicado como provável precursor, no entanto, nem sempre as metodologias disponíveis apresentam sensibilidade suficiente para detectá-lo. Por isso, muitos experimentos têm sido conduzidos *in vitro* com a adição de triptofano, que aumentaria sua produção e, conseqüentemente, sua detecção (Figura 3).

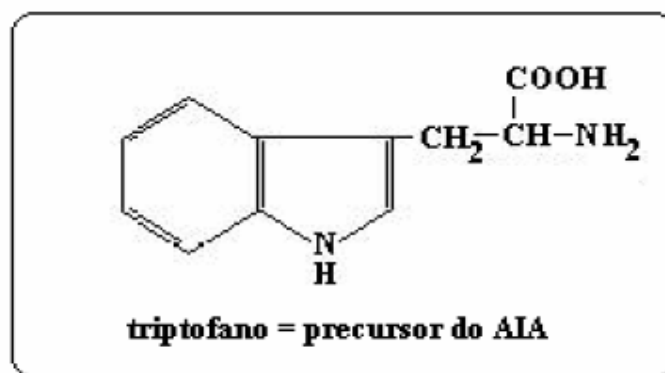


Figura 3: Molécula de Triptofano
Fonte Taiz & Zeiger, 2004.

2.2.2. Produção do AIA

Existem várias vias conhecidas para a biossíntese do AIA, destas destacam-se duas preferenciais, o triptofano participa (Figura 4). A primeira via envolve a desaminação do triptofano pela enzima triptofano transaminase, formando o ácido indol- pirúvico, seguida pela descarboxilação pela indolpiruvato descarboxilase a indol-3 acetaldeído (AIAld), o qual é convertido a AIA pela indolacetaldeído dehidrogenase. A segunda via envolve a descarboxilação do

triptofano pela triptofano descarboxilase formando triptamina, a qual é posteriormente convertida a AIAld pela amina oxidase e finalmente a AIA pela AIAld dehidrogenase (Salisbury; Ross, 1992; Arteca, 1995; Hopkins, 1999).

A inativação das auxinas endógenas, principalmente o AIA, pode ser realizada por processos enzimáticos ou fotoquímicos. O processo enzimático de oxidação do AIA, envolve um sistema conhecido como AIA-oxidase/peroxidase, no qual os principais produtos formados são o ácido oxindol acético e o metileno oxindol. No processo fotoquímico, o AIA pode ser oxidado sem a participação enzimática, quando exposto à alta intensidade luminosa. A fotodestruição pode ser promovida por pigmentos vegetais, como a riboflavina (Taiz & Zeiger, 2004). Em alguns tecidos as auxinas controlam a divisão celular. As técnicas de cultivo de tecidos foram possíveis graças à ação das auxinas sobre a divisão celular (Figura 4).

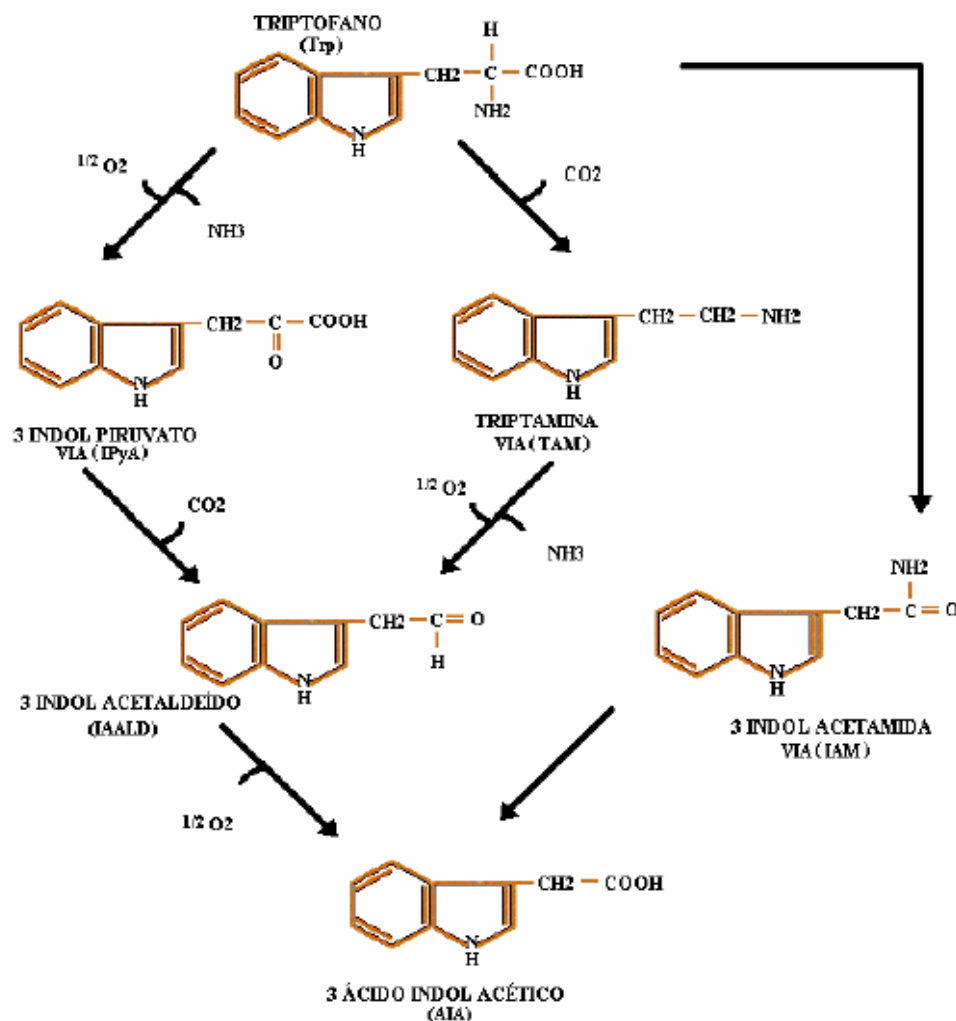


FIGURA 4. Biossíntese do 3 ácido indol acético (AIA) a partir do aminoácido triptofano.
Fonte: MARCHIORO, 2005.

A produção de AIA pode ser por realizada por fermentação Submersa (FSm) ou Fermentação em Estado Sólido (FES), sendo o primeiro mais utilizado por vários autores (Oliveira *et. al.*, 2012; Chagas-Júnior *et. al.*, 2009).

2.3. FERMENTAÇÃO SUBMERSA/FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

O desenvolvimento de um microrganismo em FES em um ambiente é caracterizada pela ausência de água livre, sobre e no interior de partículas porosas úmidas denominadas suporte ou matriz sólida, onde a matriz sólida não solúvel atua tanto como suporte físico e como fonte de nutrientes, sendo de fundamental importância a reprodução das condições de alta atividade de água e alta transferência de oxigênio que podem ser obtidas usando um material inerte impregnado com uma solução nutritiva, não sendo necessário combinar as funções substrato e suporte (Soccol, 1996; Vandenberghe *et al.*, 2000; Soccol e Vandenberghe, 2003). O teor de umidade na Fermentação no Estado Sólido adequado para a saturação do substrato varia em função da capacidade que o substrato tem de reter a água. O teor de umidade na fermentação em estado sólido não deve ser muito abundante para não reduzir a porosidade e limitar as trocas gasosas (Soccol, 1994).

Existem poucos substratos na literatura que são utilizados na produção de AIA por FES, destacando-se os sub-produtos e resíduos da agroindústria. No cenário nacional existem inúmeras oportunidades para o estabelecimento de processos industriais voltadas ao beneficiamento ou reutilização de resíduos agroindustriais, neste sentido, podem ser citados como exemplo o bagaço de cana-de-açúcar, de mandioca e o farelo de polpa cítrica (PC) (Soccol & Vandenberghe, 2003).

Geralmente utilizam-se bandejas na fermentação em Estado Sólido para aumentar o espaço de exposição ao ar, sendo a temperatura de incubação está em torno de 30°C, de acordo com o microrganismo e o tempo de fermentação de 4 a 6 dias (Soccol *et al.*, 2002).

Uma das grandes limitações de contexto industrial se refere ao controle de temperatura e umidade, fatores críticos no escalonamento do processo (Bellon-Maruel *et al.* 2003). A baixa condutividade térmica do material e seu baixo teor de umidade reduzem consideravelmente a transferência de calor, que também é dependente do tamanho das partículas da camada sólida (Rodrigues, 2006). Normalmente a temperatura é medida na camada sólida e no fluxo de gás de entrada e saída do biorreator.

O desenvolvimento de metodologias mais eficazes na produção em escala comercial com mudas de alta qualidade poderá contribuir para o desenvolvimento da canavicultura em novas áreas de plantio no Brasil, garantindo altos níveis de produção. Nesse sentido, a cultura de tecidos com a utilização de Biorreatores de Imersão por Bolhas (BIB) oferece uma oportunidade para produção em larga escala, sendo empregada como suporte para propagação.

2.4 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

A cultura de tecidos vegetais consiste no cultivo de órgãos, tecidos ou células vegetais em meio de cultivo apropriado e asséptico (livre de patógenos). É uma técnica que permite uma rápida e eficiente propagação massal de plantas. No entanto, variantes somaclonais têm sido um dos principais problemas para a utilização deste tipo de propagação comercialmente, sendo importante monitorar a estabilidade genética do genótipo propagado *in vitro*.

A técnica da cultura de tecidos pode levar a desequilíbrios entre plantas e patógenos, sendo que a limpeza dos endofíticos pode ocasionar na perda de vigor e ocasionar efeitos colaterais, maior sensibilidade a patógenos e estresses, em plantas derivadas da cultura de tecidos, pela eliminação desses micro-organismos úteis protetores contra pragas e patógenos (Azevedo, 1998; Nowak, 1998).

Na fase de aclimação as mudas são transferidas das condições *in vitro* para casa de vegetação, por um período de tempo variável, permitindo a

adaptação das plantas ao novo ambiente, diminuindo o estresse que poderia sofrer em exposição direta no campo.

Tais problemas podem ser minimizados pela reintrodução de micro-organismos endofíticos e epifíticos ainda na fase de micropropagação, determinando maior desenvolvimento fisiológico da planta, além de aumentar a resistência a agentes bióticos e abióticos, técnica essa chamada de biotização que é a resposta metabólica da planta cultivada *in vitro* ao inoculante microbiano (Nowak, 1998).

O desenvolvimento de biorreatores para multiplicação de plantas *in vitro* é descrito como o cultivo que oferece inúmeras vantagens em relação ao sistema tradicional na produção massal de mudas: além de aumentar a produtividade, reduzir custos, mantém a qualidade genética do material. No Brasil foram desenvolvidos e patenteados três sistemas de biorreatores para o cultivo de plantas, um biorreator de imersão por bolhas (UFPR), um biorreator de imersão temporária e um de imersão permanente (EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia).

2.4.1. Biorreator de Imersão por Bolhas (BIB).

O Biorreator de Imersão por Bolhas (BIB), é confeccionado com vidro temperado em formato cilíndrico, com 28 cm de altura por 9 cm de diâmetro, o funcionamento ocorre através da aeração da solução nutritiva que entra em contato com o material em cultivo (Figura 5), onde o ar é expelido através de um orifício na tampa (Soccol et al., 2008).



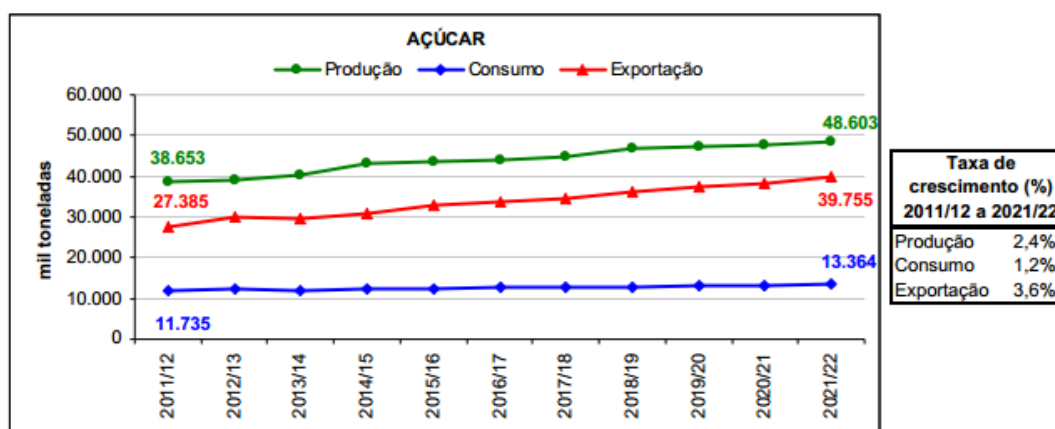
Figura 5. Biorreator de Imersão por Bolhas.
Fonte: O autor, (2012)

Por ser confeccionado com vidro temperado em formato cilíndrico os explantes podem captar mais a luminosidade e com isso desenvolver sua biomassa e, consequentemente, produzir metabólitos de interesse (Scheidt et al., 2011). A energia metabólica requerida para o desenvolvimento da planta, e a quantidade de biomassa produzida pelo vegetal pode ser definida por uma relação fisiológica baseada na quantidade de radiação melhor captada e na eficiência de conversão em matéria seca. A fotossíntese produz cerca de 90% a 95% da matéria seca ao vegetal (Magalhães *et al.* 2003; Charles-Edwards 1982).

2.5 CANA-DE-AÇÚCAR (*Sacharum officinarum* L.)

Tendo em vista a posição de destaque na economia mundial, a cultura da cana-de-açúcar (*Sacharum officinarum* L.) está freqüentemente inserida em programas de pesquisas, que buscam a introdução de características de interesse agrônomo, como a resistência a pragas e patógenos ou aumento de produtividade.

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas da economia brasileira, introduzida no período colônial. O Brasil é atualmente o maior produtor de cana-de-açúcar, e seus derivados, açúcar e etanol. É uma cultura importante dentro do agronegócio brasileiro, na produção de açúcar e álcool biocombustível, como alternativa energética. O Brasil estima obter aumento anual da produção, consumo e exportação de açúcar até a safra 2021/22, de acordo com a figura 6.

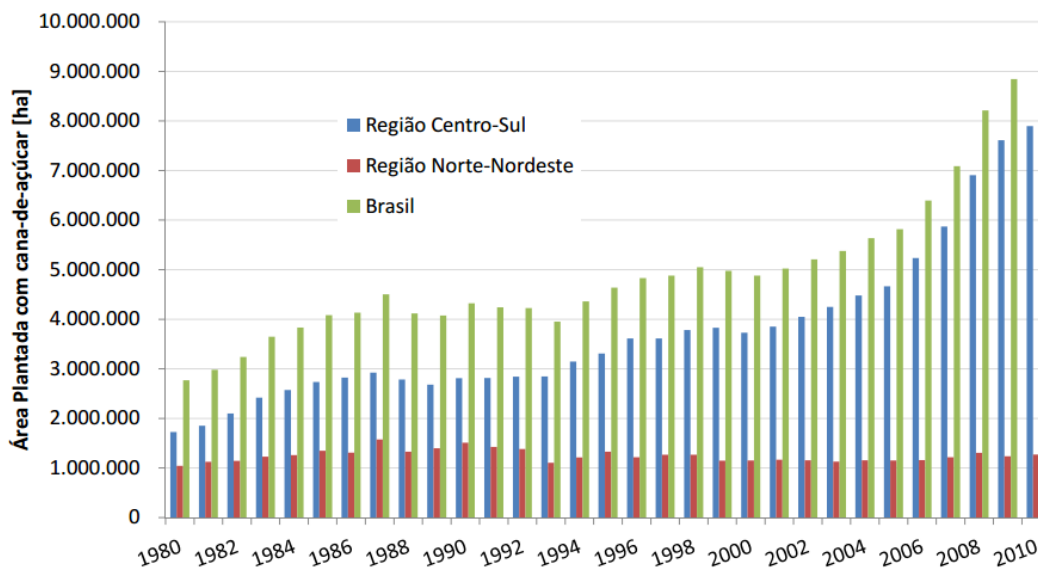


Fonte: AGE/Mapa e SGE/Embrapa

Figura 6. Estimativa da quantidade de produção, consumo e exportação de açúcar em mil toneladas para os próximos 10 anos no Brasil.

Na figura 7 está apresentada a quantidade de áreas plantadas por hectares em diferentes regiões do Brasil.

• Área Plantada



Fonte: UNICA/2012

Figura 7. Quantidade de áreas plantadas por hectares com cana-de-açúcar nos últimos 30 anos em diferentes regiões do Brasil.

A cana-de-açúcar tem propagação vegetativa a partir de segmentos de colmos denominados toletes expondo os materiais vegetais à infecção com diversos patógenos presentes no solo, ao longo dos ciclos de cultivo, com isso ocorrendo queda no potencial produtivo.

2.6. PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.)

Pertencente à família Euphorbiaceae, o pinhão manso é uma planta em forma de arbusto ou arvoreta decídua; ocorre em áreas tropicais e subtropicais, e até em algumas áreas temperadas (Costa *et al.* 2010).

Possui grande potencial para a produção de biocombustível devido a diversos atributos, tais como, resistência ao déficit hídrico, facilidade de propagação, planta perene e pode ser cultivada em uma vasta gama de condições edafoclimáticas. Cresce em solos de baixa fertilidade e precipitação, além de apresentar elevado teor de óleo (Teixeira, 2005; Saturnino *et al.*, 2005; Sujatha *et al.*, 2008). Cultivos de pinhão manso obtidos via semente apresentam uma não uniformidade nos plantios (Nunes *et al.*, 2008), daí vem a necessidade

de se desenvolver técnicas para tentar padronizar mudas em casa de vegetação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Etapas da dissertação foram desenvolvidas em alguns Laboratórios: de Engenharia de Bioprocessos localizado nas Usinas Piloto B, Microbiologia e Biologia Molecular (LabMicro) da Patologia Básica, na UFPR e no laboratório de Microbiologia aplicada da UFT. A Figura 06 apresenta o diagrama das etapas realizadas neste trabalho.

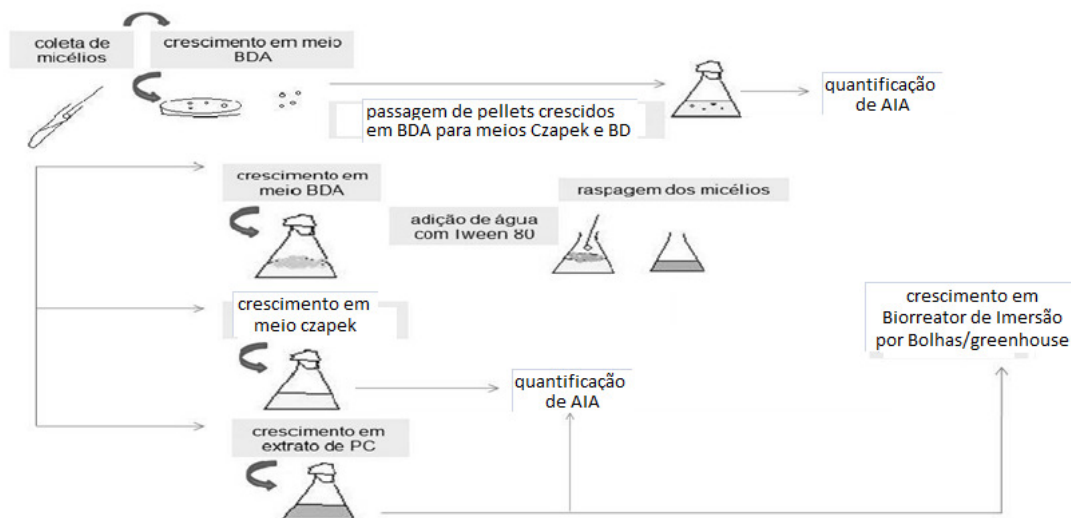


FIGURA 6 – Fluxograma geral das etapas realizadas no presente estudo.

3.1. MICRO-ORGANISMOS

3.1.1 Cepas avaliadas

Para a realização desse trabalho foram utilizadas três cepas de fungos endofíticos como controle positivo, *Beauveria bassiana*, *Penicillium* sp. e *Trichoderma* sp. do banco biológico do laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LabMicro) do Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná (UFPR). Além de, 30 fungos endofíticos isolados de folhas de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) oriundas da Área Experimental do Campus de Gurupi, Universidade Federal do Tocantins (UFT) foram igualmente testadas. A altitude da área experimental é de 280 m, e 11°43'45" de latitude e 49°04'07" de longitude. Todas as cepas foram conservadas em meio BDA sob refrigeração

(4°C) para uso imediato, e sob congelamento em *ultrafreezer* a -80°C com glicerol à 10%.

3.1.2. Isolamento dos fungos endofíticos

As cepas dos fungos endofíticos foram isoladas de pinhão manso. As folhas foram cortadas (5mm de diâmetro) e fragmentos das raízes (5mm de comprimento) foram desinfetadas sequencialmente com água destilada esterilizada (1 minuto), em álcool 70% (1 minuto) e hipoclorito de sódio 3% (4 minutos), em álcool 70% (30 segundos), seguidas de lavagem com água destilada esterilizada (6 minutos) e secagem em papel filtro esterilizado (Araújo, et., al. 2002). Desta água destilada esterilizada após a lavagem 50 µL foi retirada para fazer o controle da assepsia (Pereira, 1993).

Para o isolamento os fragmentos de folhas foram colocados no meio BDA (Merck®) com adição de antibióticos (tetraciclina 50 µg.mL⁻¹ e cloranfenicol 100 µg.mL⁻¹) e incubados em estufa (BOD – Fanem 347-CD) a 28°C por 30 dias. Foram feitos repiques sucessivos em placas de Petri contendo meio BDA até a obtenção das culturas puras e posteriormente armazenando os micélios em tubos Eppendorfs com glicerol a -80 °C.

As colônias fúngicas que se apresentavam distintas umas das outras, de acordo com as características macroscópicas (coloração e características de crescimento em meio de cultura), foram purificadas em meio BDA, preservadas pelo método da subcultura e armazenadas a ± 4 °C.

3.2. SUBSTRATOS

3.2.1. Meio Batata Dextrose (BD)

A composição do meio BD é apresentada abaixo;

Batata:	200g
Dextrose:	10g
Extrato de levedura:	1,0g
Água destilada:	1000 mL

3.2.2. BDA Vertex

39 g.L⁻¹

3.2.3. Caldo Czapek (CC)

Composição do Caldo Czapek;

Glicose:	30,0g
Extrato de levedura:	1,0g
Fosfato de Potássio (K_2HPO_4):	1,0g
Sulfato de Magnésio ($MgSO_4$):	0,5g
Sulfato de Ferro:	0,01g
Água destilada:	1000 mL

3.2.4. Obtenção e análises do substrato/suporte

A Polpa cítrica (PC) utilizada neste estudo foi gentilmente cedida pela empresa Coalma Nutrição Animal SP.

As análises físico-químicas do substrato foram determinados de acordo com a metodologia padrão descrita na A.O.A.C (2000): umidade e cinzas (termogravimétrico) e proteínas (método de Kjeldahl, 1883).

Os açúcares fermentescíveis foram dosados pela metodologia de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1945). Pesou-se 1 g da amostra para fermentação em um balão volumétrico de 100 mL. Adicionou-se cerca de 50 mL de água destilada, 2 mL de ácido clorídrico concentrado em banho-maria com água em ebulição durante 20 minutos para a hidrólise. Em seguida, o conteúdo foi resfriado e neutralizado com NaOH a 40%. Completou-se o volume com H_2O no balão volumétrico de 100 mL e posteriormente todas as amostras foram filtradas. Após a aplicação desta metodologia procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 535 nm (espectrofotômetro *Spectrum* SP2000). As análises foram realizadas em triplicata, e os resultados obtidos com base na curva padrão de glicose de 0 a 100 $\mu\text{g/mL}$ de glicose P.A.

As medidas de pH (potenciômetro Procyon – phn – 4) foram realizadas com o preparo de uma suspensão com 5g do substrato em 50 mL de água a qual foi agitada durante 10 minutos. A atividade de água (aw) pode ser medida usando diferentes métodos e equipamentos, estes, mensuram a diferença de pressão entre a mistura e a fase gasosa em equilíbrio. A medida da atividade de água da PC e do fermentado foi determinada em equipamento da marca Aqua Lab modelo CX-2.

3.2.5. Meio para fermentação em estado sólido (FES)

Experimentos iniciais para produção de ácido indol acético (AIA) por FES foram realizados utilizando o triptofano 0,5mM como precursor, na ausência de luz com 5g de substrato/suporte Polpa Cítrica (PC) em frascos Erlenmeyer de 125 mL, adicionados de 13,4 mL (para ajuste da umidade inicial em 75%) de uma solução mineral composta por (g.L⁻¹): Uréia, 1,5; K₂HPO₄, 0,2; MgSO₄.7H₂O, 1,0. O pH inicial foi ajustado para 6,0 com tampão citrato de sódio. Para o cálculo de massa de água a ser adicionada para determinar a umidade inicial foi utilizada a equação:

$$mH_2O = \frac{ms (x_2 - x_1)}{1 - x_2}$$

Onde:

mH_2O = massa de água a ser adicionada;

ms = massa de substrato seco;

x_1 = porcentagem inicial de umidade do substrato;

x_2 = porcentagem final de umidade desejada.

O meio foi autoclavado por 20 minutos a 121° C. Após resfriamento os frascos Erlenmeyer foram inoculados com *Trichoderma* sp. a uma concentração de 10⁶ esporos/g e incubados em estufa BOD a 30 °C.

3.3. SELEÇÃO DAS CEPAS PARA PRODUÇÃO DE AIA

3.3.1 Preparo do Inóculo

Os 30 fungos endofíticos isolados de folhas de pinhão manso foram transferidos dos tubos de ensaio (10 mL) contendo o meio BDA para novo meio BDA em placas de petri com crescimento em câmara de incubação (BOD – Fanem 347-CD) por um período de 10 dias em temperatura constante de 28°C.

Micélios dos fungos endofíticos foram coletados e repicados em placas de Petri em meio BDA e incubado a 28 °C por 7 dias, antes do início dos testes das fermentações para produção de AIA.

Utilizaram-se 5 fragmentos de micélio (5 x 5 mm) os quais cultivados em placas e então inoculados em 100 mL do meio Caldo Czapek em frascos de Erlenmeyer de 250 mL. Os frascos foram incubados em um agitador do tipo *shaker* à 30°C, 120 rpm, por 72 horas. Após o crescimento dos pellets, estes foram filtrados em tecido TNT instalado em uma peneira de inox como suporte previamente esterilizados. Este procedimento foi realizado no fluxo laminar.

3.3.2 Recuperação de esporos/ contagem de esporos

Os esporos foram recuperados da superfície do meio utilizando-se 25 mL de solução 0,01% de *Tween* 80 contendo pérolas de vidro e uma barra magnética. Com o auxílio de um agitador magnético, a solução adicionada sobre os esporos foi mantida sob agitação durante 15 minutos.

Para determinar a concentração de esporos para contagem em microscópio eletrônico utilizou a câmara de Neubauer (Tabela 6):

$$(\sum 5 \text{ quadrados}) \times (5 \times 10^4) \times \text{diluição:}$$

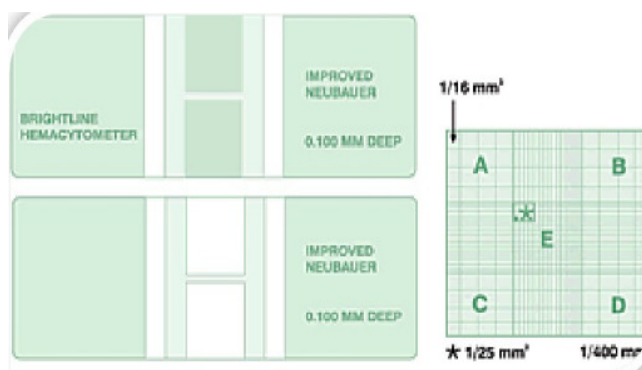


FIGURA 7 - CÂMARA DE NEUBAUER

Fonte: Joana Filipa, 2010

3.3.3. Seleção das cepas/meios de cultura para produção de inóculo

Os fungos endofíticos (3 cepas do banco biológico do laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, LabMicro, e 30 isolados de folhas de pinhão manso) foram testados para produção de ácido indolacético (AIA) em Caldo Czapek com triptofano 0,5 mM como precursor para biossíntese do AIA. O AIA foi produzido na ausência de luz, aos 5 dias de cultivo a 30°C.

3.3.4 Seleção qualitativa/quantitativa de AIA

A análise qualitativa de AIA foi determinada pela técnica do reagente de Salkowski. O princípio dessa técnica é a indicação da coloração apresentada pela reação química. A reação de uma solução de AIA com o reagente de Salkowski (0,5M de FeCl_3 em 7,9M de H_2SO_4) resulta numa coloração amarelada (teste negativo) e rosa avermelhado para o teste positivo. Esse método colorimétrico baseia-se na oxidação de compostos indólicos por sais férricos (Mayer, 1958), resultando na coloração rósea.

A análise qualitativa de AIA foi determinada misturando-se 500 μL do sobrenadante do extrato fermentado com 500 μL de ácido de reagente Salkowski permanecendo ao abrigo da luz por 30 minutos.

A análise qualitativa do aia foi realizada pelo método de Loper (Loper *et al.*, 1986). Para essa análise foram realizadas leituras do sobrenadante do extrato fermentado em espectrofotômetro (espectrofotômetro *Spectrum* SP2000) com um comprimento de onda de 540nm. As leituras foram feitas através da curva padrão obtida com concentrações entre 0, 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 (μM do padrão de AIA).

A cepa *Trichoderma* sp. foi cultivada em FES com PC como substrato/suporte impregnado com uma solução contendo $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,3 \text{ g.L}^{-1}$) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$), de forma a ajustar a umidade inicial de 75%. O pH inicial foi ajustado para 6,0 e a fermentação ocorreu em 5 dias a 30 °C. As fermentações foram realizadas em condições de temperatura, quantidade de meio, razão de inóculo e tempo de fermentação de acordo com a Tabela 1. Os procedimentos de extração também foram avaliados para comparação dos tipos de fermentação. Após a seleção dos isolados de pinhão manso para produção de AIA de acordo com a Tabela 6 procedeu-se o teste para avaliação das

condições das fermentações submersas e em estado sólido para seleção das cepas.

Tabela 1. Condições iniciais das fermentações para seleção das cepas de fungos endofíticos para produção de Ácido Indol Acético, *Beauveria bassiana*, *Penicillium* sp. e *Trichoderma* sp. (controle positivo) e os fungos isolados do pinhão manso que apresentaram os melhores resultados para a biossíntese de AIA (isolado 07, isolado 18, isolado 19 e isolado 20).

Condição	Fermentação Submersa	Fermentação em Estado Sólido
Temperatura (° C)	30	30
pH inicial	5,5	5,5
Razão de inóculo	10% (V/V)	10% (V/m)
Umidade inicial (%)	-----	75
Rotação (rpm)	120	-----
Tempo (dias)	5	5

3.3.5. Otimização de variáveis físicas do Fermentado (pH e umidade %) e fontes de nitrogênio.

Após a seleção de cepas, foram realizadas otimizações das variáveis físicas: pH, umidade (%). As faixas de pH testadas foram 5,5; 6,5 e 7,5. Foram testadas as seguintes variações de umidades 65%, 75% e 80%. E um variável química; fonte de nitrogênio (NH_4Cl , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, uréia e extrato de levedura em concentrações de 1,0 g/g de PC seca e sem adição de nitrogênio) para a produção de AIA.

3.3.6. Avaliação de cinética para produção de esporos utilizando FES

Foi realizado um estudo da cinética da produção de AIA durante 5 dias a 30 °C em triplicata com as condições otimizadas: pH 6,0, taxa de inoculação 10% (v/m), PC apenas moída com granulometria entre 2 mm e 0,8 mm e 75% de umidade inicial. A umidade foi ajustada com a adição de solução nutritiva contendo extrato de levedura a 1,0 g.L⁻¹ e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 1,5 g.L⁻¹.

3.4. PROPAGAÇÃO *in vitro* DE CANA-DE-AÇÚCAR (var. RB 72.454)

3.4.1 Estabelecimento *in vitro* da variedade de cana-de-açúcar RB 72.454

Folhas jovens meristemáticas (palmito) da variedade RB 72.454 de cana-de-açúcar foram utilizadas como explantes para o estabelecimento *in vitro* de acordo com o protocolo descrito por Dibax *et al.* (2011). Os explantes foram coletados de plantas (com dois meses) originadas de propagação vegetativa e cultivadas em casa-de-vegetação. Os explantes foram desinfestados com imersão em álcool 70% (v/v) por dois minutos e imersos novamente em solução de NaOCl 2% (v/v) por 30 minutos, após esses procedimentos, os explantes foram lavados três vezes com água destilada e estéril. Estes foram seccionados em partes de 50 mm e imersos por 30 min em solução antioxidante composta por 250 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico, 25 mg.L⁻¹ de ácido cítrico e 1 g.L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP). Os explantes foram isolados em placas de Petri contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962) com metade da concentração de ferro, 30 g.L⁻¹ de sacarose e solidificados com 7 g.L⁻¹ de agar. O pH foi ajustado para 5,8. Os explantes foram incubados na ausência de luz por 30 dias de cultivo.

3.4.2. Multiplicação *in vitro*

Brotações de cana-de-açúcar variedade RB 72.454 foram cultivadas em meio MS líquido, com redução do FeSO₄.7H₂O do meio MS pela metade, 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,2 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) e 0,1 mg.L⁻¹ de 6-furfurilaminopurina (KIN). O pH foi ajustado para 5,8. Subcultivos foram realizados a cada 20 dias para obtenção do número suficiente de plantas para a instalação do experimento com o Biorreator de Imersão por Bolhas - BIB.

3.4.3. Avaliação da concentração de esporos de *Trichoderma* sp.no co-cultivo de cana-de-açúcar utilizando o Biorreator de Imersão por Bolhas BIB.

O meio basal usado foi o MS com metade da concentração de ferro, 30 g.L⁻¹ de sacarose e 1 gota de Tween[®] 80 para cada 250 mL de meio de cultura. O pH foi ajustado para 5,8 e autoclavados a 120°C por 15 minutos.

Vinte e cinco brotos (5 cm) de cana-de-açúcar foram utilizados como explantes. Os tratamentos avaliados foram: (1) Testemunha (contendo meio basal sem inoculação do fungo); (2) Meio basal em co-cultivo com inóculo de 1x10³ esporos/mL de *Trichoderma* sp.; (3) Meio basal em co-cultivo com inóculo de 1x10⁴ esporos/mL de *Trichoderma* sp. e (5) Meio basal em co-cultivo com inóculo de 1x10⁵ esporos/mL de *Trichoderma* sp.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento durante 15 dias, temperatura controlada de 25±2°C, sob luz branca fria (40 µM.m⁻².s⁻¹), com 16 horas de fotoperíodo. A altura da parte aérea (cm), número de folhas, número de brotos, número de raízes, número de folhas necrosadas, percentual de sobrevivência, percentual de oxidação, massa fresca total (g), massa fresca da parte aérea (g), massa fresca das raízes (g), massa seca total (g), massa seca da parte aérea (g), massa seca das raízes (g) foram analisados aos 15 dias de cultivo *in vitro*.

Plantas completas de cana-de-açúcar tiveram suas raízes lavadas em água esterilizada, em seguida, levadas para a casa de vegetação para aclimatização, sendo plantadas em bandejas de 128 alvéolos, com substrato comercial Plantmax[®] HT, para serem avaliadas em 30 dias quanto à altura da parte aérea, número de folhas, massa fresca da parte aérea, massa fresca das raízes, massa fresca total, massa seca da parte aérea, massa seca das raízes e massa seca total.

3.5 Testes de germinação e vigor de sementes de pinhão manso.

O teste de germinação e vigor das sementes de pinhão manso consistiram dos tratamentos: (1) Testemunha (Papel filtro molhado com água destilada); (2) Suspensão de esporos em água destilada-estéril contendo 1x10⁷ esporos.mL⁻¹ de *Trichoderma* sp.); (3) Suspensão de esporos em água destilada-estéril contendo 1x10⁸ esporos.mL⁻¹ de *Trichoderma* sp.); (4)

Suspensão de esporos em água destilada-estéril contendo 1×10^9 esporos.mL⁻¹ de *Trichoderma* sp.

Foi realizada a análise de sanidade de sementes conforme Brasil (2009). Neste teste, cada tratamento consistiu de 200 sementes, divididas em quatro repetições com 50 sementes, colocadas para embebição em papel germitest umedecido com água destilada, na proporção de 2,5 vezes o peso do papel umedecido com água destilada contendo os devidos tratamentos. Em seguida, foram encaminhados para sala climatizada com temperatura de 20° C e fotoperíodo de 12 horas, permanecendo pelo período de 8 dias.

No quinto dia ocorreu a primeira contagem de germinação, contando o número de plântulas normais e os resultados expressos em porcentagem. Após oito dias, realizou-se a contagem final de germinação, determinando a porcentagem de plântulas normais, segundo as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009). Foram avaliadas ainda; porcentagem de plântulas anormais, sementes não germinadas, comprimento da parte aérea (cm), comprimento da radícula (cm), comprimento total (parte aérea mais radícula) e massa seca total (g).

3.6 Efeito de *Trichoderma* sp. no crescimento de pinhão manso em casa de vegetação.

Para a germinação e crescimento inicial de mudas de pinhão manso peletizadas em extrato fermentando com diferentes quantidades de inoculo de *Trichoderma* sp. (*Trichoderma* sp. crescido em polpa cítrica) em casa de vegetação, foram avaliados: Germinação, Altura de parte aérea, Emergência, Índice de velocidade de emergência, Altura da planta, Comprimento da raiz, Comprimento total da plântula, Matéria seca da plântula aos quinze dias após o plantio. As sementes de pinhão manso foram semeadas em vasos contendo o substrato comercial Plantmax® HT. Os tratamentos consistiram de diferentes proporções do extrato fermentado de polpa cítrica com *Trichoderma* sp. misturado com uma semente por vaso, essas diferentes proporções do extrato fermentado foram: 0, 350, 700 e 1000 mg (1×10^9 esporos /mL) por semente. O

delineamento experimento foi inteiramente casualizado com quatro repetições de 20 sementes.

O índice de qualidade de Dickson (IQD) foi determinado em função da massa seca total (MST), da altura da parte aérea (H), do diâmetro do coleto (DC), da massa seca da parte aérea (MSA) e da massa seca das raízes (MSR), por meio da fórmula:

$$\text{IQD} = \frac{\text{MST (g)}}{\text{H (cm)/ DC (mm) + MAS (g)/ MSR (g)}}$$

3.7. Análise estatística.

O delineamento estatístico usado foi inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de comparação múltipla de médias de Duncan ou Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os dados oriundos de percentagem foram transformados para arcosseno $\sqrt{x/100}$ e os de contagem para $\sqrt{x+1}$. Os dados foram processados com auxílio do programa computacional GENES (CRUZ, 2001).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO DA POLPA CÍTRICA

A polpa cítrica utilizada apresentou 11,3% de umidade, 5,67% de cinzas, 5,61% de proteínas totais, 18,74% de açúcares totais, 10,21% de açúcares redutores, 0,621 de atividade de água (a_w) e pH de 5,56. O pH utilizado para o processo de produção de AIA em FES se situa entre 5,0 e 6,0 para evitar contaminações com outros micro-organismos, o que indica que a polpa cítrica é um substrato adequado para esse processo. As análises de umidade, cinzas e proteínas demonstraram resultados semelhantes com os valores máximos ótimos para o crescimento de micro-organismos que estão em 12,0% e 8,0% para umidade e cinzas, respectivamente e de 5,0% para proteínas totais (Abecitrus, 2011). O valor da a_w da PC (0,621) foi considerado satisfatório para estocagem do substrato, considerando que a PC vai ser utilizada em FES. A a_w da PC em estudo está abaixo do ideal para o desenvolvimento de micro-organismos, evitando contaminações indesejáveis durante a estocagem. No entanto, a atividade de água inicial deverá ser ajustada para a fermentação, entre os valores de 0,92 a 0,99 para *Trichoderma* spp. (Forsythe, 2002; Cavalcante *et al.*, 2008). Os resultados para açúcares totais e redutores foram semelhantes aos encontrados em polpa cítrica usada para FES com *Fusarium moniliforme* (Rodrigues, 2006).

4.2. ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE CEPAS PARA PRODUÇÃO DE AIA

A partir de fragmentos de folhas cultivadas em meio de cultura BDA, foram obtidos os primeiros isolados de fungos endofíticos (Figura 1). Dos 140 fragmentos de folhas coletados foram obtidos 30 isolados de fungos, como mostra a Tabela 2.

O controle do processo de desinfecção dos fragmentos coletados de *Jatropha curcas* L. mostrou-se eficaz eliminando micro-organismos epifíticos e garantindo assim o crescimento seletivo dos fungos endofíticos. Tal fato foi constatado devido à metodologia de isolamento empregada dos fungos

endofíticos. Após a desinfecção, o grupo controle (Figura 7. A), constituído de 50 μ L de água do último processo de desinfecção superficial, não apresentou crescimento de fungos, ou qualquer outro tipo de microrganismo após o seu esgotamento em meio de cultura BDA.

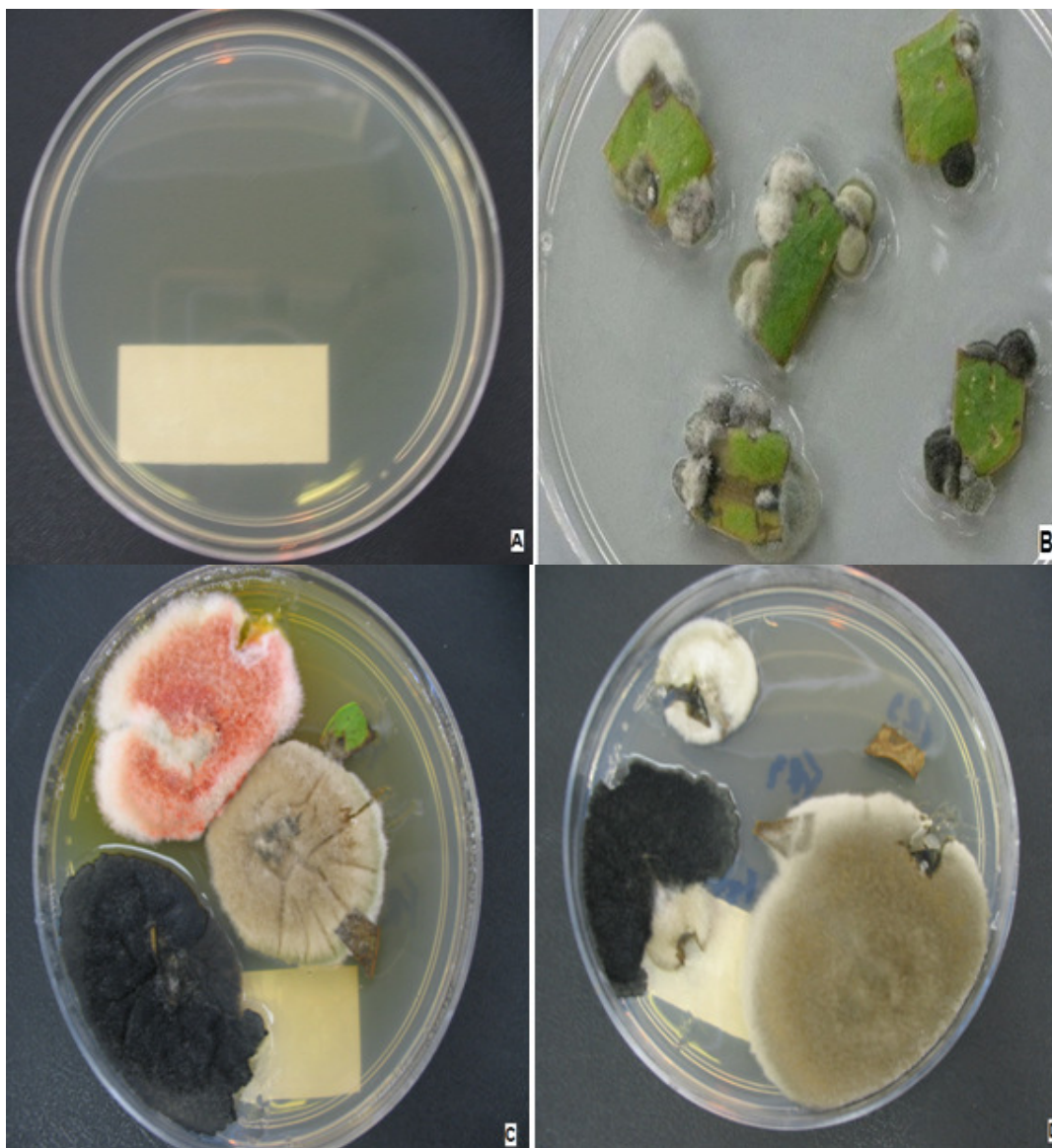


Figura 7. **A** - Controle negativo constituído de 50 μ L de água final do processo de desinfecção. **B** - Folhas de *Jatropha curcas* L. após 4 dias de isolamento em em meio de cultura BDA a 28°C. **C e D**- Colônias de fungos isolados de folhas de *Jatropha curcas* L. após 10 dias de isolamento e cultivo em meio de cultura BDA a 28°C.

Foram analisados 30 cepas isoladas em relação à produção de AIA, destas, quatro cepas (Isolados 7, 18,19 e 20) apresentaram reação positiva de produção de AIA em meio Czapek com 0,5mM de triptofano (Tabela 2).

Tabela 2. Seleção de fungos endofíticos isolados do pinhão manso para produção de AIA. Legenda: (+) Isolado com habilidade de produzir AIA e (-) Isolado sem habilidade de produzir AIA. Resultados obtidos pelo teste qualitativo de Salkowski.

Isolados	AIA
1	-
2	-
3	-
4	-
5	-
6	-
7	+
8	-
9	-
10	-
11	-
12	-
13	-
14	-
15	-
16	-
17	-
18	+
19	+
20	+
21	-
22	-
23	-
24	-
25	-
26	-
27	-
28	-
29	-
30	-

Das cepas usadas como controle positivo, não foi observado resultado positivo para os extratos fúngicos oriundos da fermentação pelo fungo *Beauveria bassiana* em nenhum dos meios fermentescíveis para produção de AIA. As

cepas de *Penicillium* sp. e *Trichoderma* sp. apresentaram resultado positivo para a produção do AIA pelo método qualitativo.

Os resultados encontrados para a produção do AIA em dois tipos de processos fermentativos; Fermentação Submersa em Caldo Czapek (FSm) e Fermentação em Estado Sólido utilizando Polpa cítrica-FES, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Fungos endofíticos produtores de AIA por FSm e FES após 5 dias de cultivo (com 0,5mM de triptofano e ausência de luz). Isolado 7, 18, 19 e 20 são oriundos de folhas do pinhão manso. Os experimentos foram conduzidos no escuro.

	FSm	FES
Cepas	AIA (mg.L ⁻¹)	AIA (mg.g ⁻¹ PC seca)
<i>Trichoderma</i> sp.	49,5aB ¹	55,6aA
<i>B. bassiana</i>	-----	-----
<i>Penicillium</i> sp.	7,1eB	25,9dA
Isolado 07	12,6d	-----
Isolado 18	27,5cB	35,6cA
Isolado 19	31,7bB	40,2bA
Isolado 20	25,8cB	33,5cA

¹ Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5%.

Os resultados com a cepa *Trichoderma* sp. foram superiores em comparação com as demais cepas produtoras de AIA de acordo com o teste de Scott Knott a 5% de probabilidade, independente dos meios de cultivos utilizados. A FES foi superior a FSm para o *Trichoderma* sp, resultando numa produção de 55,6 mg de AIA/g PC seca foi atingida em FES, já em FSm a produção foi de 49,5 mg.L⁻¹. Resultados inferiores foram encontrados por Oliveira *et al.*, 2012 utilizando os meios líquidos Batata Dextrose e meio FAN (Fan, 2002) com produções de 14,8 µg.mL⁻¹ e 14,3 µg.mL⁻¹, respectivamente, aos quatro dias com *Trichoderma* sp. Uma possível explicação para os baixos resultados pode ser o fato dos experimentos não terem sido conduzidos ao abrigo da luz, considerando que o AIA é degradado pela luz. Bandeira *et. al.*, 2011 trabalhando com 125 isolados de *Trichoderma* sp., destes, 44 isolados foram positivos para produção de AIA em meio TSA (Trypticase Soy Agar).

Chagas-Júnior *et. al.*, (2009) em experimentos com rizóbios na presença de 150 mg.mL⁻¹ do triptofano, produziram de 1.360 a 2.660 µg.mL⁻¹ de AIA. Os isolados de pinhão manso tiveram resultados inferiores quando comparados ao *Trichoderma* sp., mas podem ser fontes de futuros trabalhos na otimização de produção de AIA, bem como, desenvolvimento de novos produtos com aplicações biotecnológicas.

4.3. Padronização e influência dos meios de cultura sobre a produção de AIA.

Após selecionar o *Trichoderma* sp. para a produção de AIA, foi avaliada a sua produção com e sem triptofano em dois diferentes meios de cultivo de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4. Produção de AIA por *Trichoderma* spp. em diferentes meios de cultivo (CC - Caldo Czapek, BD - Batata Dextrose) sem e com triptofano a 0,5mM e em função do tempo (horas). Os experimentos foram conduzidos no escuro.

Tempo (h)	CC (µg.mL ⁻¹)		BD (µg.mL ⁻¹)	
	sem	com	sem	com
24	-----	-----	-----	-----
48	-----	6,56e	-----	-----
72	1,24dB ¹	17,45dA	-----	2,3c
96	2,23cC	43,85bA	2,5bC	7,4bB
120	3,87aC	48,82aA	5,4aC	6,7bB
144	3,24bC	44,16bA	2,3bC	27,6aB
168	2,76bC	42,50bA	2,1bC	29,8aB
192	1,85cB	23,45cA	-----	25,4aA

¹ Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro.

O *Trichoderma* sp. produziu uma máxima concentração de 48,82 µg.mL⁻¹ de AIA em Caldo Czapek após 120 horas de fermentação. Em meio BD o ápice de produção ocorreu em 168 horas atingindo 29,8 µg.mL⁻¹ de AIA. Esses resultados indicam um período ótimo de produção para cada cepa (característica genética) em condições específicas de cultivo (características ambientais), o que

deverá ser considerado para a interrupção do processo para a obtenção do AIA, devido ao fato de que após o período ideal de produção, a quantidade de AIA começa a diminuir. Resultados inferiores foram encontrados por Oliveira *et al.*, (2012) para a produção de AIA usando *Trichoderma* sp., utilizando os meios BD e FAN apresentaram $18,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $19,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AIA, respectivamente. Robinson et al., 1998 trabalhando com 18 isolados do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* encontraram produção de AIA de 2 a 32 mg.L^{-1} . Já Souchie *et al.*, 2007 trabalhando com cinco fungos solubilizadores de fósforo identificados como *Aspergillus* sp. produziram AIA *in vitro* variando de 0,6 a 24 mg.L^{-1} .

Meios de cultura com suplementação de L-triptofano apresentaram maior produtividade de AIA com relação aos meios de cultura isentos de L-triptofano, esses resultados foram estatisticamente significativos.

4.3.1. Avaliação da adição de fontes de nitrogênio na produção de aia por *Trichoderma* sp em FES

A concentração de nitrogênio necessária para o crescimento do micro-organismo é extremamente importante para o acúmulo de biomassa e para a produção de AIA. A produção de AIA em diferentes fontes de nitrogênio está apresentada na tabela 5.

Tabela 5. Produção de AIA com adição de diferentes fontes de Nitrogênio aos cinco dias de FES com *Trichoderma* sp. Os experimentos foram conduzidos no escuro.

Fontes de N	Produção de AIA (mg/g de PC seca)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	38,9b
NH_4Cl	39,5b
NH_4NO_3	38,4b
Uréia	53,4a
Extrato de levedura	55,3a
S/N*	51,8a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

*Sem adição de nitrogênio.

Os melhores resultados para a produção de AIA foram o extrato de levedura, a Uréia e o controle (sem adição de nitrogênio), obtendo 55,3; 53,4 e 51,8 mg/g de PC seca, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si. Desta forma optou-se pela não adição de nitrogênio complementar ao meio de fermentação, pois a quantidade de nitrogênio presente na polpa cítrica é suficiente para o desenvolvimento do micélio de *Trichoderma* sp. na produção de AIA. A polpa cítrica é um substrato complexo com teores consideráveis de nitrogênio, apresentando cerca de 5% de nitrogênio (Melo et al., 2011).

4.3.2. Otimização das variáveis pH e umidade na produção de AIA por *Trichoderma* sp em FES.

Na otimização das variáveis pH e umidade os melhores resultados obtidos com *Trichoderma* sp. foram em pH 5,5 e umidade de 75% com produção de 56,4 mg/g de PC seca, (Tabela 6).

Tabela 6. Variação do pH e Umidade inicial para produção de AIA por *Trichoderma* sp. em FES usando como substrato polpa cítrica, sob condição no escuro.

Tratamentos	Umidade (%)	pH	produção de AIA (mg/g de PC seca)
1	65	5,5	38,3 e ¹
2	75	5,5	56,4 a
3	80	5,5	34,3 f
4	65	6,5	44,1 c
5	75	6,5	52,1 b
6	80	6,5	44,5 c
7	65	7,5	33,6 f
8	75	7,5	41,3 d
9	80	7,5	21,6 g

¹ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro.

Na literatura existem poucos trabalhos relacionando fermentação em estado sólido para produção de AIA por micro-organismos. Rodrigues, 2006 trabalhando com PC otimizou algumas variáveis tais como pH, umidade para a

produção de Ácido Cítrico, em valores de 5,5 e 65%, respectivamente. Analisando os tratamentos com 75% de umidade verifica-se que o aumento do pH diminuiu significativamente a produção do AIA

4.4. Co-cultivo de *Trichoderma* sp. com brotações de cana-de-açúcar

Na tabela 7 está descrita a avaliação de brotos de cana-de-açúcar da variedade 72 454 co-cultivada com *Trichoderma* sp. em Biorreator de Imersão por Bolhas aos 15 dias de cultivo.

Tabela 7. Avaliação da altura da parte aérea (AP cm), número de brotos (NB), número de folhas (NF), número de raízes (NR), comprimento médio das raízes (CR), massa fresca total (MF g) de cana-de-açúcar variedade 72 454 produzida em co-cultivo com *Trichoderma* sp. em Biorreator de Imersão por Bolhas aos 15 dias de cultivo *in vitro*..

	AP cm	NB	NF	NR	CR cm	MFT g
Controle	7,2 b ¹	3,6 a	14,0 a	4,7 ab	0,72 a	0,328 b
1x10 ³ esporos/mL	7,9 a	3,7 a	14,1 a	6,2 a	0,85 a	0,435 a
1x10 ⁴ esporos /mL	5,8 c	1,1 b	9,0 a	3,0 bc	0,53 a	0,153 c
1x10 ⁵ esporos /mL	5,3 c	1,2 b	3,3 b	1,3 c	0,45 a	0,071 c
CV(%)	6,7	17	18,4	19,9	36,3	26,9

¹ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si para cada parâmetro pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Os tratamentos com o fungo endófito *Trichoderma* sp. em diferentes concentrações de inóculo não diferiram estatisticamente do controle pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade em relação à variável comprimento de raiz, provavelmente pelo alto coeficiente de variação (CV%).

Broto de cana-de-açúcar em co-cultivo com *Trichoderma* sp. com inóculo 10³ esporos/mL mostraram resultados significativos superiores para altura de plantas e massa fresca total 7,9 cm e 0,435 g, respectivamente, de acordo com o teste de Duncan a 5% de probabilidade em relação aos demais tratamentos. Resultados semelhantes foram encontrados por Silva *et. al.*, 2006 que inocularam isolados fúngicos provenientes de graviola (*Annona muricata* L.) em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.), esses isolados promoveram o

crescimento da biomassa seca da parte aérea e de raiz, evidenciando que isolados de um hospedeiro podem facilmente colonizar hospedeiros de espécies diferentes, até mesmo com maior intensidade. Fato observado por Silveira *et al.* 2004 com isolados de bactérias epifíticas promotoras de crescimento de plantas obtidas de couve, rabanete e repolho sendo inoculadas em pepino com sucesso para acúmulo de matéria seca da parte aérea, matéria seca da raiz e matéria seca total. Silva *et. al.*, (2006) inocularam diversos fungos endofíticos, tais como, *Colletrotrichum* sp., *Acremonium* sp. em solo desinfestado utilizando discos com 5 mm cultivados em meio BDA durante cinco dias, os quais foram inoculados no interior da cova de plantio de cada planta (muda), em contato com o sistema radicular. Esse co-cultivo favoreceu o incremento da biomassa seca total. Sesquiterpenos de plantas induzem ramificações de hifas em fungos micorrízicos arbusculares, que são fungos que formam associações mutualísticas simbióticas com as raízes de mais de 80% das plantas (Akiyama *et al.* 2005). Existem poucos trabalhos na literatura falando sobre a promoção de crescimento de plantas através da utilização de fungos endofíticos.

Na Figura 8A observa-se plantas de cana-de-açúcar multiplicadas em BIB sem inoculação de *Trichoderma* sp. e brotos de cana-de-açúcar com inoculação de 1×10^3 esporos/mL de *Trichoderma* sp. (figura 6B), tecidos apresentando oxidação em parte das folhas basais. A ocorrência de oxidação nos tecidos da cana-de-açúcar pode ter ocorrido na fase inicial do co-cultivo com o fungo *Trichoderma* sp. devido à liberação de compostos fenólicos de defesa da planta, esse tipo de resposta pode ocorrer por diversas razões, mas todas elas resultantes do estresse oxidativo que ocorre nos tecidos sob condições não favoráveis (Figura 8).

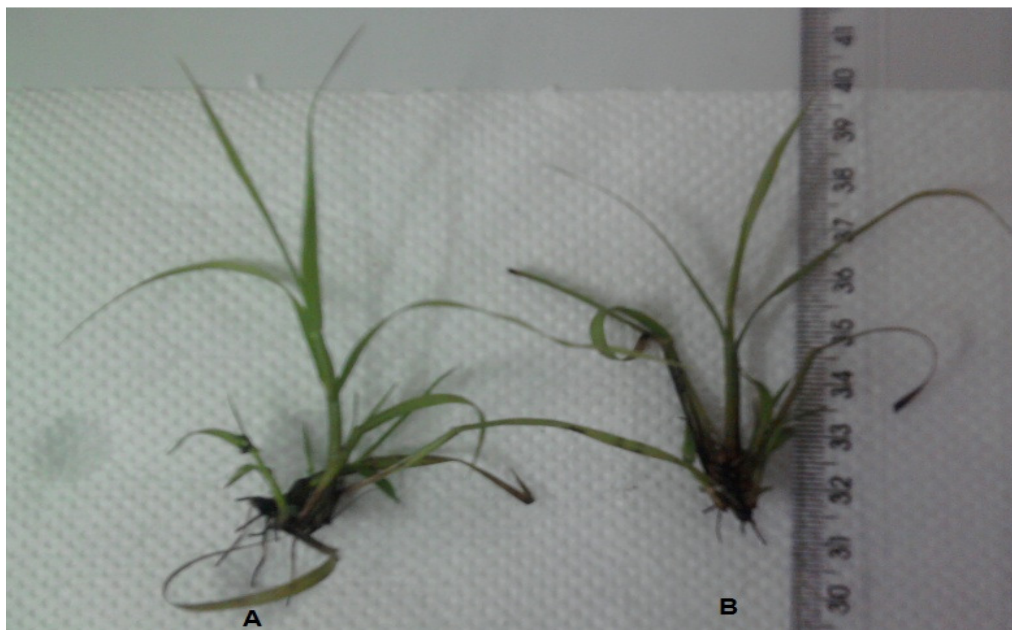


Figura 8. Plantas de cana-de-açúcar cultivadas em Biorreator de Imersão por Bolhas (BIB) após 15 dias de cultivo. **A** - planta de cana-de-açúcar sem inoculação com *Trichoderma* sp. **B** – com inoculação de 1×10^3 esporos por mL de *Trichoderma* sp.

No co-cultivo do *Trichoderma* sp. com cana-de-açúcar inoculada a 1×10^6 esporos/mL, as plantas não se desenvolveram, propiciando aumento rápido de biomassa do *Trichoderma* sp. inibindo o crescimento da planta e ocorrendo em algumas partes da plantas oxidação de alguns tecidos (Figura 9).



Figura 9. Cana-de-açúcar co-cultivada com *Trichoderma* sp. (1×10^6 esporos/mL), após 15 dias de cultivo no Biorreator de Imersão por Bolhas (BIB).

Atribui-se esse fato (Figura 9) ter acontecido devido à competição por nutrientes do meio de cultivo entre o fungo endofítico e a planta em estudo, além de prováveis substâncias tóxicas exsudadas das células fúngicas para o meio de co-cultivo.

Brotos de cana-de-açúcar co-cultivados com *Trichoderma* sp. em biorreator de imersão por bolhas após 15 dias apresentaram raízes formadas, essas plantas completas foram transferidas para casa de vegetação para avaliar o efeito peletizante sobre as mudas, esses resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Efeitos da co-cultura de *Trichoderma* sp. na aclimatização de brotos de cana-de-açúcar variedade RB 72-454 após 30 dias de cultivo em casa de vegetação. Altura da parte aérea (AP cm), número de folhas (NF), massa fresca da parte aérea (MFPA g), massa fresca das raízes (MFR g), massa fresca total (MFT g), massa seca da parte aérea (MSPA g), massa seca das raízes (MSR g) e massa seca total (MST g).

	AP cm	NF	MFPA g	MFR g	MFT g	MSPA g	MSR g	MST g
Controle	18,0 b ¹	9,8 a	2,5 b	0,498 b	2,989 b	0,449 b	0,086 b	0,535 b
1x10 ³ esporos/mL	18,9 a	10,2 a	2,7 a	0,551 a	3,258 a	0,490 a	0,115 a	0,606 a
1x10 ⁴ esporos/mL	15,9 c	6,1 b	1,5 c	0,135 c	1,695 c	0,145 c	0,010 c	0,156 c
CV(%)	3	2,1	2,1	3,1	2,2	5	6,4	4,3

¹ Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

Na aclimatização em casa de vegetação o tratamento com inóculo 1x10³ esporos/mL apresentou resultados superiores aos demais tratamentos, em todas as variáveis com exceção no número de folhas em relação ao controle (Tabela 8). Na figura 10 podem ser visualizadas as diferenças no crescimento de brotos de cana-de-açúcar entre o tratamento controle (Figura 10^a) e aquele onde foi inoculado *Trichoderma* sp. a 1x10³ esporos/mL.

O aumento da biomassa seca na parte aérea e da raiz indica melhoria na qualidade de mudas. Algumas espécies apresentam maiores taxas de sobrevivência quando possuem maiores reservas de carboidratos na sua biomassa, conseqüentemente plântulas com menos biomassa apresentam maiores taxas de mortalidade.

Na promoção de crescimento das mudas de pinha quando analisada a variável biomassa seca da raiz não foi observado incremento provocado pelos

fungos endofíticos (Silva *et. al.*, 2006). Uma possível explicação seria devido à competição por nutrientes do solo entre o fungo endofítico e a planta. Na interação entre os micro-organismos endofíticos e plantas hospedeiras podem ocorrer diversas reações, como do tipo benéficas, neutras ou prejudiciais.

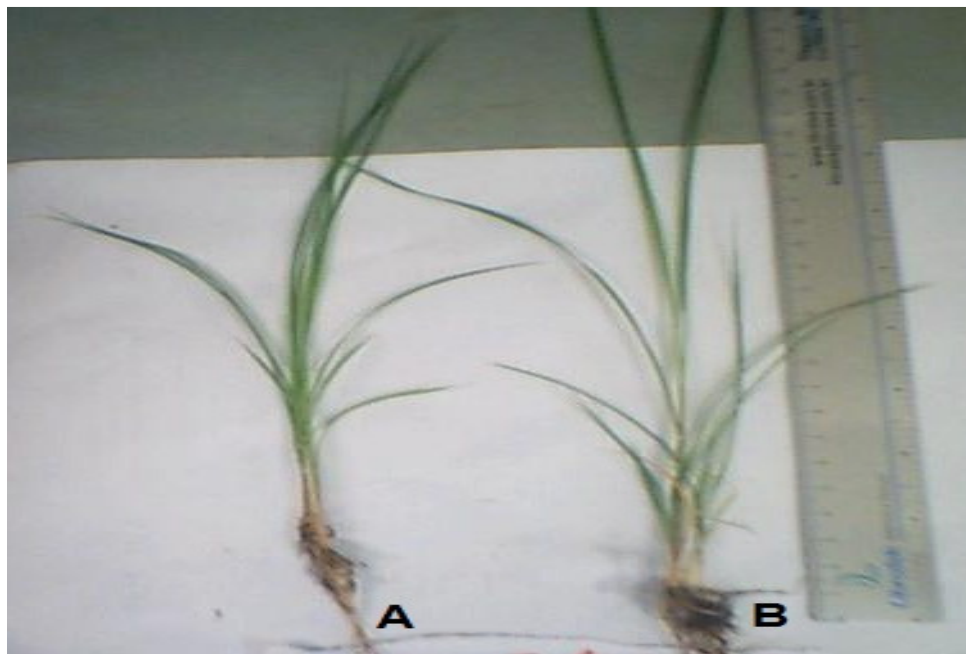


Figura 10. Plantas aclimatizadas de cana-de-açúcar após 30 dias de cultivo em casa de vegetação. A - Planta de cana-de-açúcar sem inoculação. B – Inoculada com *Trichoderma* sp. 1×10^3 esporos/mL.

4.5. GERMINAÇÃO DE SEMENTES E CRESCIMENTO INICIAL DE MUDAS DE PINHÃO MANSO PELETIZADAS COM *Trichoderma* sp.

As maiores porcentagens de emergência das sementes de pinhão manso foram obtidas para a testemunha e com as sementes peletizadas com 1×10^7 esporos/mL de *Trichoderma* sp., apresentando , 62,1% e 61,5% de germinação aos cinco dias, respectivamente (Tabela 9).. O mesmo ocorreu para germinação aos oito dias (G), onde a testemunha e sementes de pinhão manso inoculadas com *Trichoderma* sp. (1×10^7 esporos/mL) obtiveram 90% e 89%, respectivamente, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 9).

TABELA 9. Germinação de sementes e crescimento inicial de sementes de pinhão manso embebidos ou não (Testemunha) com esporos de *Trichoderma* sp em papel germitest. Primeira contagem de germinação aos cinco dias (PC). Germinação aos oito dias (G), plântulas anormais (Pa), sementes não germinadas (Sm), comprimento de parte aérea (PA cm), comprimento de raiz (CR cm), comprimento total (CT cm) e massa seca total (MST g) de plântulas oriundas de sementes de pinhão manso submetidas a diferentes tratamentos em condições controladas, 20° C, após oito dias de germinação.

Tratamentos	PC %	G %	Pa %	Sm %	PA cm	CR cm	CT cm	MST g
Testemunha	62,1a	90a	11a	5a	13,7a	2,1a	15,8a	0,92a
1x10 ⁷ esporos/mL	61,5a	89a	8a	4a	12,5ab	1,7a	14,2b	1,10a
1x10 ⁸ esporos /mL	57,9b	85b	9a	6a	14,4a	1,9a	16,3a	1,21a
1x10 ⁹ esporos /mL	56,4b	81b	7a	7a	11,2b	1,5b	12,7c	1,29a
CV%	22,5	5,6	27,5	12,4	15,6	7,8	5,6	7,1

Médias, seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Ainda na tabela 9 a variável plântulas anormais (Pa), sementes não germinadas (Sm) e massa seca total (MST) de plântulas de pinhão manso verifica-se que os tratamentos não diferiram significativamente entre si. Com relação ao comprimento de parte aérea (PA), comprimento de raiz (CR) e comprimento total (CT), os tratamentos apresentaram diferenças estatísticas entre si.

Observa-se na tabela 10 uma variação de 65% a 71% para emergência de plântulas de pinhão manso e o índice de velocidade de germinação variou 0,9 a 1,1, verificando-se que os tratamentos não diferiram significativamente entre si. Com relação ao índice de velocidade de emergência (IVE), altura da parte aérea (PA) e biomassa seca total da plântula (MST), as sementes de pinhão manso não apresentaram diferenças estatísticas em todos os tratamentos. (Tabela 10).

TABELA 10. Germinação e altura de parte aérea das mudas de pinhão manso peletizadas com diferentes quantidades de inoculo de *Trichoderma* sp. Emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), altura da planta (PA), comprimento da raiz (CR), comprimento total da plântula (CT), matéria seca da plântula (MST), quinze dias após o plantio.

Tratamentos *	E (%)	IVE	PA (cm)	CR (cm)	CT (cm)	MST (g)
Testemunha	70a ¹	1,1a	3,1a	1,1a	4,2a	0,97a
B350	71a	1,1a	2,8a	1,3a	4,1a	1,10a
B700	69a	0,9a	2,8a	0,9b	3,7b	1,10a
B1000	65a	1,0a	2,7a	1,2a	3,9ab	0,99a

CV%	32,5	5,6	27,5	7,8	5,6	7,1
-----	------	-----	------	-----	-----	-----

¹ Médias, seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si para cada parâmetro pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

*Testemunha (T); P350 (*Trichoderma* sp.; 350mg/semente); P700 (*Trichoderma* sp.; 700mg/semente); P1000 (*Trichoderma* sp.; 1000mg/semente).

Estes resultados são discordantes com os encontrados por Windhan et al. (1986), os quais, trabalhando com sementes de tomate e fumo em solos autoclavados e inoculadas com *Trichoderma*, observaram aumento na emergência das plântulas. Já Resende, 2003 encontrou redução no índice de velocidade de emergência quando inoculou *Trichoderma harzianum* em sementes de milho. Farias et al., 2003, apresentaram porcentagem de germinação e emergência mais elevadas trabalhando com sementes de algodão tratadas com *Trichoderma harzianum* que proporcionaram plântulas mais vigorosas. É provável que o tipo de interação entre um micro-organismos e uma planta específica apresente diferentes resultados para o desenvolvimento vegetal, dependendo do tipo de relação ecológica formada entre os diferentes seres, tais relações poderão ser relações harmônicas ou desarmonicas.

A matéria seca variou de 0,97 a 1,1g não diferindo estatisticamente entre os tratamentos pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Resultados diferentes foram encontrados na inoculação de *Trichoderma viride* em sementes de alface proporcionando aumento de massa seca da parte aérea das mudas (DINIZ et. al., 2006).

A avaliação aos 60 dias após a emergência das sementes e crescimento inicial de pinhão manso (cultivadas em casa de vegetação) inoculado com diferentes quantidades de extratos fermentados usando polpa cítrica pelo *Trichoderma* sp. e controle estão apresentados na tabela 11.

Tabela 11. Crescimento inicial de plantas de pinhão manso oriundas de sementes peletizadas com diferentes quantidades de extrato fermentado de *Trichoderma* sp. Altura da parte aérea (AP cm), diâmetro do coleto (DC), número de folhas (NF), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca das raízes (MFR), massa fresca total (MFT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca das raízes (MSR), massa seca total (MST) e índice de qualidade de Dickson (IQD).

Tratamento	AP (cm)	DC (cm)	NF	MFPA (g)	MFR (g)	MFT (g)	MSPA (g)	MSR (g)	MST (g)	IQD
Testemunha	20,21b ¹	1,33a	7,53a	21,32a	4,2a	27,02a	3,9a	0,44a	4,34a	0,16a
B350	18,65b	0,96b	6,47b	19,18b	3,3b	23,46c	3,7a	0,38b	4,05a	0,15a
B700	19,5b	1,03a	6,7b	22,28a	3,5b	25,86ab	3,7a	0,38b	3,98a	0,15a

B1000	24,08a	1,26a	7,3a	22,82a	4,3a	27,19a	3,8a	0,46a	4,47a	0,17a
-------	--------	-------	------	--------	------	--------	------	-------	-------	-------

[†] Médias seguidas pela mesma letra nas colunas para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

*Testemunha (T); P350 (*Trichoderma* sp.; 350mg/semente); P700 (*Trichoderma* sp.; 700mg/semente); P1000 (*Trichoderma* sp.; 1000mg/semente).

De acordo com análise estatística o tratamento B1000 foi aquele que propiciou maior crescimento de parte aérea (24,08 cm), enquanto para as demais variáveis avaliadas não houve diferenças estatísticas. Segundo PRATES *et al.* 2007 a aplicação do fungo *Trichoderma* spp. no substrato em casa de vegetação promoveu crescimento de folhas, caules e raiz em mudas de citros. Já para o tratamento sem aplicação do *Trichoderma* spp., foi verificado menor comprimento das raízes.

Avaliando diferentes métodos de inoculação de bactérias para mudas micropropagadas de abacaxizeiro, MELLO *et al.*, 2002 verificaram que o melhor método foi o de imersão do sistema radicial em uma solução chamada de bacterização.

A figura 11, 12 e 13 apresentam os resultados das plantas de pinhão manso peletizadas com diferentes quantidades de extrato fermentado de *Trichoderma* sp.com 60 dias de crescimento em casa de vegetação.



Figura 11. Plantas de pinhão manso após 60 dias em casa de vegetação oriundas de sementes peletizadas com diferentes quantidades de extrato fermentado de *Trichoderma* sp.



Figura 12. Comparação das plantas de pinhão manso em casa de vegetação (controle) e oriundas de sementes peletizadas com 1000 mg de extrato fermentado de *Trichoderma* sp. por semente.

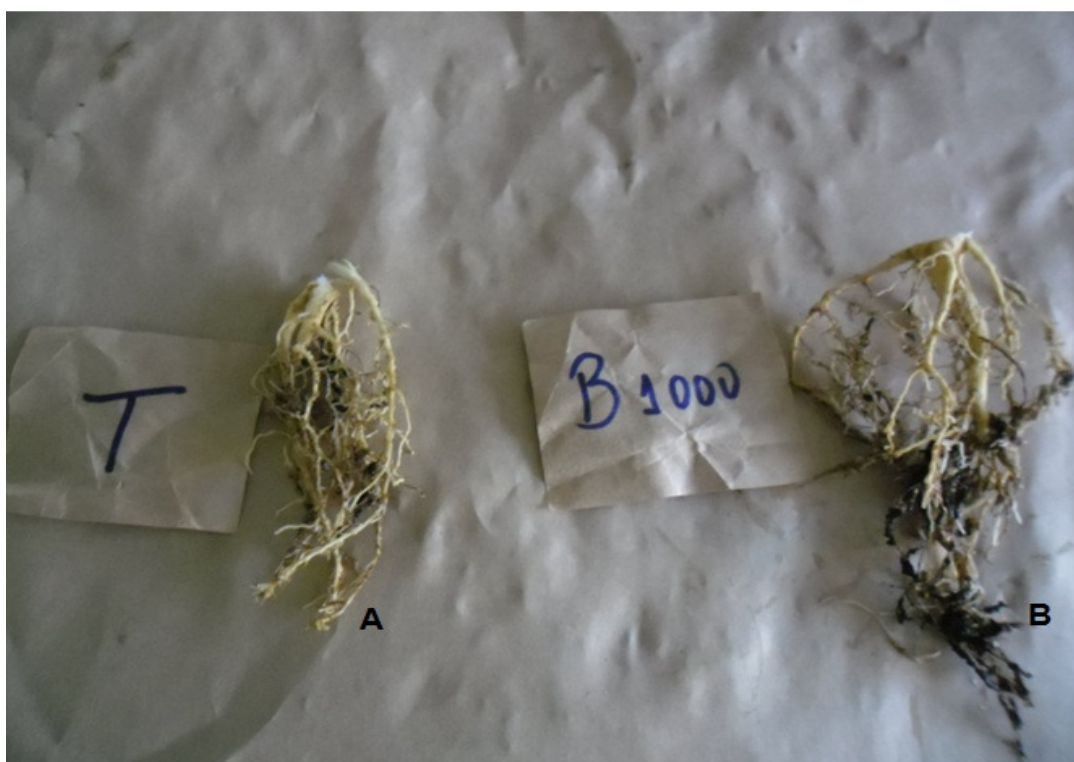


Figura 13. Comparação das raízes de plantas de pinhão manso em casa de vegetação (controle) e oriundas de sementes peletizadas com 1000 mg de extrato fermentado de *Trichoderma* sp. por semente.

5. CONCLUSÕES

Não foi possível obter um inoculante com fungos endofíticos de folhas do pinhão manso devido a baixa produtividade de AIA das cepas isoladas.

O emprego de Triptofano 0,5 mM nos ensaios de produção de AIA favoreceu o crescimento do *Trichoderma* sp., sendo a única cepa que apresentou produção de AIA acima de 50 mg.L⁻¹ em cinco dias de cultivo.

A fermentação em estado sólido utilizando polpa cítrica favoreceu a produção de AIA comparada com a fermentação submersa.

Quando comparado ao controle, a utilização de *Trichoderma* sp. na quantidade de inóculo de 1x10³ esporos/mL foi a que promoveu maior crescimento de brotos de cana-de-açúcar cultivados em Biorreator de Imersão por Bolhas-BIB.

Na aclimatização quando comparado ao controle, a utilização de *Trichoderma* sp. (com Inóculo 1x10³ esporos/mL) foi a que promoveu maior crescimento de brotos de cana-de-açúcar *in vitro*.

Nas quantidades avaliadas o extrato fermentado de polpa cítrica com o *Trichoderma* sp. não influenciou o crescimento das mudas de pinhão manso, com exceção na altura da parte aérea.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Testar tempo de viabilidade de esporos de *Trichoderma* sp. e armazenamento em diferentes temperaturas e em diversos substratos.

Testar fungos endofitos isolados de pinhão manso para inoculação *in vitro* e *ex vitro*.

Co-cultivar *in vitro* diferentes órgãos e tecidos de plantas para observar a interação planta-fungo endofítico através de microscopia de varredura.

Testar e aprimorar um inoculante de *Trichoderma* sp. com cana-de-açúcar a campo.

Testar micro-organismos em sementes de plantas não-leguminosas a campo.

7. REFERÊNCIAS

- Associação Brasileira de Citricultores. ABECITRUS. Exportação de Laranja. Disponível em www.abecitrus.com.br. Acessado em: 26/07/2008. Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br/subprobr.html>>.
- ABAISSA - Disponível em: <http://www.abaiassa.com.br/polpacitrica>. Acessado em 14/07/2012
- AKIYAMA, K.; MATSUZAKI, K.; HAYASHI H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. **Nature**. 435: 824–827, 2005.
- ARAÚJO, W.L.; SARIDAKIS, H.O.; BARROSO, P.A.V.; AGUILAR- VILDOSO, C.I.; AZEVEDO J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 229-236, 2001.
- AZEVEDO, J.L. Micro-organismos Endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.) **Ecologia Microbiana**. Ed. EMBRAPA, Jaguariúna-SP. p.129-135, 1998.
- AZEVEDO, J.L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada?. **Revista brasileira de Botânica**. São Paulo, v.22, n.2 (suplemento), p.225-229, 1999.
- BALOTA, E.L.; LOPES, E.S.; HUNGRIA, M.; DOBEREINER, J. Interações e efeitos fisiológicos de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, n.11, p.1335-1345, 1995.
- BANDEIRA, M.A.; SILVA, G.B.; LUSTOSA, D.C. Caracterização bioquímica dos isolados de *Trichoderma* sp. associadas a espécies florestais da base de urucu-AM. Anais do 9º **Seminário Anual de Iniciação Científica**, Universidade Federal Rural do Amazonas, UFRA, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Produção Vegetal. Coordenação de Laboratório Vegetal. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, DF, 1992. 365p.
- CARROLL, G.C. Fungal endophytes in stem and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, v.69, p. 2-9, 1988.
- CARVAJAL, L.H.; ORDUZ, S.; BISSETT, S. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological control**. v.51, p. 409–416, 2009.
- CAVALCANTE, R.S.; LIMA, H.L.S.; PINTO, G.A.S.; GAVA, C.A.T.; RODRIGUES, S. Effect of moisture on *Trichoderma* conidia production on Corn

and Wheat Bran by Solid State Fermentation. **Food and Bioprocess Technology**, v1, p.100-104, 2008.

CHAGAS-JÚNIOR, A.F.; OLIVEIRA, L.A.; OLIVIERA, A.N. Produção de ácido indolacético por rizóbios isolados de caupi. **Revista Ceres**. v. 56, n.6, p. 812-817, 2009.

COSTA, J.L.; SILVA, A.L.L.; SCHEIDT, G.N.; LEMUS, E.A.E.; SOCCOL, C.R. Estabelecimento in vitro de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) - Euphorbiaceae. **Caderno de Pesquisa Série Biologia**, v. 22, p. 5-12, 2010.

COSTA, J.L.; LIMA, R.P.; SILVA, A.L.L.; SCHEIDT, G.N.; ERASMO, E.A.L. Crescimento inicial de plantas de pinhão manso em função do sombreamento no município de Gurupi-TO. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 4, p. 43-47, 2011.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 2001, 648p.

DIBAX, R.; ALCANTARA, G.B.; BESPALHOK-FILHO, J.C.; MACHADO, M.P.; OLIVEIRA, Y.; SILVA, A.L.L. Plant regeneration of sugarcane cv. RB931003 and RB98710 from somatic embryos and acclimatization. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, p. 32-37, 2011.

DURÁN, E.L.; PLOPER, L.D.; RAMALLO, J.C.; PICCOLO GRANDI, R.A.; HUPPER GIANCOLI, Á.C.; AZEVEDO, J.L. The foliar fungal endophytes of Citrus limon in Argentina. **Canadian Journal of Botany**, v. 83, p. 350-355, 2005.

FAN, L. **Produção de exopolissacarídeos de *Agaricus blazei* e teste antitumorais**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2002. 86p. Tese Doutorado.

FARIA, A. Y. K.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; NETO, D. C. Qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro submetidas a tratamentos químico e biológico. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.25, n.1, p.121-127, 2003.

FORSYTHE, S.J.; **Microbiologia de Segurança alimentar**, Porto Alegre: Artmed, 12-19, 2002.

KLOEPPER, J.W. Host specificity in microbe-microbe interactions. **BioScience**, v. 46, n. 6, p. 406-409, 1996.

LOBO JUNIOR, M.; GERALDINE, A. M.; CARVALHO, D. D. de. Controle biológico de patógenos habitantes do solo com *Trichoderma* spp., na cultura do feijoeiro comum. Santo Antônio de Goiás: **Embrapa Arroz e Feijão, Circular técnica**, 85, 2009. 4 p.

LOPER, J. E.; SCHROTH, M.N. Influence of bacterial sources of indol-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. **Phytopathology**, v.76, p.386-389, 1986.

LUDWIG-MÜLLER, J. Indole-3-butyric acid in plant growth and development. **Plant Growth Regulation** 32: 219–230, 2000.

LU, H.; ZOU, W.X.; MENG, J.C.; HU, J.; TAN, R.X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, v. 151, p. 67–73, 2000.

MAYER, A.M. Determination of indole acetic acid by the Salkowsky reaction. **Nature**, v.162 p.1670-1671, 1958.

MARCHIORO, L. E. T. 2005. **Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Parana (UFPR), Curitiba, Brasil.

MELO, A. L.; SANCHUKI, C. E.; WOICIECHOWSKI, A. L.; THOMAZ-SOCCOL, V.; SOCCOL, C. R. Use of poultry litter as culture medium of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Berliner for control of *Aedes aegypti* Linnaeus. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, p. 1-6, 2011.

MELLO, M. R. F.; MARIANO, R. L. R.; MENEZES, M.; CÂMARA, T. R.; ASSIS, S. M. P. Seleção de bactérias e métodos de bacterização para promoção de crescimento em mudas de abacaxi micropropagadas. **Summa Phytopathologica**. V. 28, p. 222-228, 2002.

MOHR, H.; SCHOPFER, P. **Plant physiology**. 629p. Berlin: Springer-Verlag, 1995.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-380, 1944.

NOWAK, J. Benefits of in vitro “biotization” of plant tissue cultures with microbial inoculants. **In Vitro Cell and Development Biology Plant**, Largo, v.34, p. 122-130, 1998.

NUNES, C. F.; PASQUAL, M.; SANTOS, D. N.; CUSTÓDIO, T. N.; ARAÚJO, A. G. Diferentes suplementos no cultivo in vitro de embriões de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 43, p. 09-14, 2008.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal Microbiology**, v.42, p.207-220, 1996.

PEREIRA, J. O.; CARNEIRO-VIEIRA, M. L.; AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, p. 37-40, 1999.

PETRINI, O. 1991 Fungal endophytes of tree leaves. In *Microbial Ecology of Leaves*, eds. Andrews, J.H. & Hirano, S.S. pp. 179–197. New York: **Springer-Verlag**. ISBN 0-38797–5799.

PETRINI, O.; STONE, J.; CARROLL, F. E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. **Canadian Journal of Botany**, v. 60, p. 789-796, 1992.

PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; HYDE, K.D. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. **Mycological Research**, v. 105, n. 12, p. 1508-1513, 2001.

PIMENTEL, I. C. **Fungos endofíticos do milho (*Zea mays* L.) e de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e seu potencial biotecnológico no controle de pragas agrícolas**. 153f. Tese (Doutorado) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

RECH FILHO, A. **Sistemas de imersão temporária e unidades encapsuláveis como ferramentas para a consolidação de protocolos para a micropropagação de bromélias**. (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, p. 74, 2004.

ROBINSON, M. et al. Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis in *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *Aeschynomene*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 64, n. 12, p. 5030-5032, 1998.

RODRIGUES, C., 2006. **Desenvolvimento de Bioprocesso para Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido Utilizando Polpa Cítrica**, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Brasil.

RODRIGUES, K.F. The foliar endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. **Mycologia**, v. 86, n. 3, p. 376-385, 1994.

RODRIGUES, K.F.; SAMUELS, G.J. Fungal endophytes of *Spondias mombin* leaves in Brazil. **Journal of Basic Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 131-135, 1999.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S.H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T.J. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecological System**, v. 29, p. 319–343, 1998.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant Physiology**. 4 ed. Califórnia: Wadsworth, 1992. 682 p.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma: A guide to identification and biology*. Beltsville: **USDA/ARS**, p. 54, 2006.

SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N., GONÇALVES, N. P. Caracterização mineral de partes de plantas de pinhão

manso (*Jatropha curcas* L.). **Informe agropecuário**. v. 26, n. 229, 2005, p. 44-78.

SCHEIDT, G. N.; SILVA, A. L. L.; OLIVEIRA, Y.; COSTA, J. L.; BIASI, L.A. AND SOCCOL, C.R. In vitro growth of *Melaleuca alternifolia* Cheel in bioreactor of immersion by bubbles. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, p. 2937-2939, 2011.

SDA/MAPA. MINISTERIO DA AGRICULTURA PECUARIA E ABASTECIMENTO. Brasília, 2009. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/fertilizantes>.

SES - Secretaria de Estado da Saude. Normas **Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, 1985; 523.

SILVA, A. L. L., BISOGNIN, D. A., BARRIQUELLO, C. J., RITTER, C. E. L. Germinação in vitro de sementes de mogango (*Cucurbita pepo* L.) - Cucurbitaceae. **Ciência e Natura**, v. 27, p. 19-28, 2005.

SILVA, R. L. O.; LUZ, J. S.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta botânica brasileira**. V. 20, n.3, p. 649-655. 2006

SILVEIRA, E. B.; GOMES, A. M. A.; MARIANO, R. L. R. & SILVA NETO, E. B. Bacterização de sementes e desenvolvimento de mudas de pepino. **Horticultura Brasileira**, v. 22 n. 2, 217-221, 2004.

SOCCOL, C. R. **Contribuição ao estudo da fermentação no estado sólido em relação com a produção de ácido fumárico, biotransformação de resíduo sólido de mandioca por *Rhizopus* e *Basidiomacromicetos* do gênero *Pleurotus***. Tese (Prof. Titular) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1994. 228 p.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, 2002.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**. v.13, p.205-218, 2003.

SOCCOL, C. R.; SCHEIDT, G. N.; MOHAN, R. Biorreator do tipo imersão por bolhas para as técnicas de micropropagação vegetal. Universidade Federal do Paraná. Patente (**DEPR. 01508000078**). 03/03/ 2008.

SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p. 61-68, 1945.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Indolacetic acid production by P-solubilizing microorganisms and

interaction with arbuscular mycorrhizal fungi. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. v. 29, n. 3, p. 315-320, 2007.

SUJATHA, M., REDDY, T. P., MAHASI, M. J. Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. **Biotechnology Advances**. v. 26, 2008, p. 424-435.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Rev.** V.24(4), p.487-506, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p

TEIXEIRA, L. C. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. **Informe Agropecuário**. v. 26, n. 229, 2005, p. 18-27.

KAUR-BRAR, S. Biocontrol: Management, Processes and Challenges. In Chapter 10. **Fungi application as biological control agents in agriculture and animal husbandry**. BRAND, D.; RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L.P.S.; MEDEIROS, A.B.P.; FERNANDEZ, D. R.; HALFEN, G. E.; DA SILVA, A.L.L.; COSTA, J. L.; SOCCOL, V.T.; SOCCOL, C.R. Nova publishers, Quebec, Canadá, 2012.

UNIAO FARELOS – disponível em www.uniaofarelos.com.br/. Acessado em 10 de Julho de 2012.

VANDENBERGHE, L.P.S; SOCCOL, C.R; PANDEY, A.; LEBEAULT, J.M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 2, 175-178, 2000.

WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; PANPHUT, W.; THONGON, N.; DANWISSEKJANA, K.; RUANGRUNGSI, N.; MEEVOOTISOM, V. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated. **World Journal Of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, n. , p.265-272, 2004.

ZIV, M. Bioreactor Technology for plant micropropagation. **Horticultural reviews**. v.24, p.1-30, 2000.

ANEXOS

Leis/Normativas sobre regulação de Inoculantes no Brasil

1. Lei Nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980
2. Decreto Nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004 - Regulamentação da Lei
3. Instrução Normativa Nº 10, de 6 de maio de 2004 - Regras para produção, fiscalização, etc
4. Instrução Normativa Nº 35, de 4 de julho de 2006 - Corretivos, condicionadores...
5. Instrução Normativa Nº 5, de 23 de fevereiro de 2007 - Fertilizantes minerais
6. Instrução Normativa Nº 25, DE 23 de julho de 2009 - Fertilizantes orgânicos...
7. Instrução Normativa Nº 5, de 6 de agosto de 2004 - Inoculantes
8. Instrução Normativa Nº 14, de 15 de dezembro de 2004 - Substrato para plantas...
9. Instrução Normativa Nº 27, de 5 de junho de 2006 - Contaminantes, patógenos...
10. Instrução Normativa SDA Nº 24, de 20 de junho de 2007 - Reconhecimento métodos...
11. Instrução Normativa SDA Nº 17, de 21 de maio de 2007 - análises substratos...
12. Instrução Normativa SDA Nº 28, de 27 de julho de 2007 - Métodos oficiais análises...